

Hämoxygenase-Expression im Nervus ischiadicus: Veränderungen nach Läsion im Organkulturmodell

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Tanja Christina Fischer, geb. Pawlitschek
aus Darmstadt

Gießen 2001

Aus der Medizinischen Betriebseinheit
Institut für Anatomie und Zellbiologie
Leiter: Prof. Dr. W. Kummer
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. W. Kummer
Gutachter: Prof. Dr. W. Kummer
Gutachter: Prof. Dr. W. Schachenmayr

Tag der Disputation: 10.12.2001

Für meine Eltern

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	13
3. ERGEBNISSE	34
4. DISKUSSION	48
5. ZUSAMMENFASSUNG	61
6. LITERATUR	63
7. LEBENSLAUF	76
8. DANKSAGUNG	77

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1 Metabolismus des Häms	2
1.2 Hämoxygenase	5
1.2.1 Biochemie, Struktur und Funktion	5
1.2.2 Kohlenmonoxid als Mediator	7
1.2.3 Bilirubin als Antioxidans	8
1.3 Hämoxygenasen im Nervensystem	10
1.4 Fragestellung und Ziel	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Material	13
2.1.1 Versuchstiere	13
2.1.2 Nervenquetschung in Organkultur	13
2.1.3 Gewebebearbeitung	14
2.2 Methoden	16
2.2.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie	16
2.2.1.1 Einfache Immunfluoreszenz	16
2.2.1.2 Spezifitätskontrollen	19
2.2.1.3 Doppelimmunfluoreszenz	19
2.2.1.4 Mikroskopische Auswertung	20
2.2.2 Elektronenmikroskopie	21
2.2.3 Biochemische Arbeitstechniken	23
2.2.3.1 SDS-PAGE	23
2.2.3.2 Proteinpräzipitation	24
2.2.3.3 Proteinquantifizierung nach Bradford	24
2.2.3.4 Western Blot	26
2.2.3.5 Immuninkubation	28
2.2.4 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	30
2.2.4.1 Material	30
2.2.4.2 RNA-Isolierung	30
2.2.4.3 DNase-Verdau	31
2.2.4.4 Reverse Transkription	31
2.2.4.5 Polymerasekettenreaktion	32
2.2.4.6 Kontrollen	33

3. ERGEBNISSE	34
3.1 Das Modell des N. ischiadicus in Organkultur	34
3.2 Immunhistochemie: Lokalisation der Hämoxygenasen im ungequetschten Nerven	36
3.2.1 HO-1	36
3.2.2 HO-2	36
3.3 Immunhistochemie: Lokalisation der Hämoxygenasen nach Nervenläsion	38
3.3.1 HO-1	38
3.3.2 HO-2	39
3.3.3 Kontrollen	42
3.4 Western-Blot-Analyse	43
3.4.1 HO-1	43
3.4.2 HO-2	44
3.4.3 Spezifitätskontrollen	46
3.5 RT-PCR	47
4. DISKUSSION	48
4.1 Die Organkultur des Nervus ischiadicus als Modell	48
4.2 Hämoxygenase-1 (HO-1)	50
4.2.1 HO-1 im ungequetschten Nervus ischiadicus	50
4.2.2 HO-1 im gequetschten Nervus ischiadicus	51
4.3 Hämoxygenase-2 (HO-2)	52
4.3.1 HO-2 im ungequetschten Nervus ischiadicus	52
4.3.2 HO-2 im gequetschten Nervus ischiadicus	54
4.4 Funktionelle Bedeutung der Hämoxygenasen bei peripherer Nervenquetschung	56
5. ZUSAMMENFASSUNG	61
6. LITERATUR	63
7. LEBENS LAUF	76
8. DANKSAGUNG	77

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN:**Abbildungen**

Abb. 1	Schema des Abbaus von Häm zu Biliverdin	4
Abb. 2	Organkultur des N. ischiadicus des Meerschweinchens	35
Abb. 3	Vergleich der HO-1 und HO-2 Immunreaktivität	37
Abb. 4	HO-1 Immunreaktivität im kultivierten N. ischiadicus	38
Abb. 5	Querschnitt durch den N. ischiadicus	39
Abb. 6	HO-2 Immunreaktivität im kultivierten N. ischiadicus	40
Abb. 7	Immunreaktivität für HO-2 und für Vimentin	41
Abb. 8	Kontrolle der Spezifität der Immunreaktion	42
Abb. 9	Western-Blot Analyse der HO-1 Immunreaktivität	43
Abb. 10	Western-Blot Analyse der HO-2 Immunreaktivität	45
Abb. 11	Spezifitätskontrolle der Western-Blot-Analyse	46
Abb. 12	Nachweis der HO-2-mRNA mittels RT-PCR	47
Abb. 13	Schematische Übersicht der Befunde	60

Tabellen

Tab. 1	Übersicht über die Isoformen der Hämoxygenase (EC 1.14.99.3)	6
Tab. 2	Liste der verwendeten Primärantikörper	18
Tab. 3	Liste der verwendeten Sekundärantikörper und Tertiärreagenzien	18
Tab. 4	Verwendete Filterkombinationen	20

1. EINLEITUNG

Hämoxygenase (E.C.1.14.99.3) ist ein Enzym, das den ersten Schritt des Abbaus von Häm zu Gallenpigmenten katalysiert. Das bekannteste Beispiel dafür ist der Hämoglobinabbau aus Erythrozyten, der hauptsächlich in Milz und Leber stattfindet. Die biochemischen Grundlagen dieser Abbauvorgänge wurden in den vergangenen 30 Jahren weitgehend geklärt (Übersicht bei Maines 1992). Die von der Hämoxygenase katalysierte Reaktion von Häm zu Biliverdin unter Entstehung von Kohlenmonoxid (CO) und Eisen als Nebenprodukt wurde dabei als reiner Abbauvorgang verstanden. Die Erkenntnis, dass die entstehenden Produkte CO und Biliverdin (bzw. dessen Folgeprodukt Bilirubin) physiologisch wirksam sein können, hat zu einem breitgefächerten Interesse an Hämoxygenasen geführt. In der Neurobiologie gilt nach der Identifizierung von Stickstoffmonoxid (NO) als Prototyp einer neu entdeckten Klasse gasförmiger Transmitter Kohlenstoffmonoxid (CO) als ein weiterer möglicher neuer Mediator (Marilena 1997). Zuvor wurde dem Hämabbau im Nervensystem allenfalls im Rahmen von Bilirubinenzephalopathien („Kernikterus“) des Neugeborenen Bedeutung zugesprochen, wo eine Hemmung der Hämoxygenasen als therapeutische Möglichkeit vorgeschlagen wurde (Valaes et al. 1994).

Aus Biliverdin, dem zweiten Produkt der Hämoxygenase-Reaktion, entsteht als Folgeprodukt Bilirubin. Diesem Bilirubin wird eine Bedeutung als physiologisch wirksame antioxidative Substanz zugeschrieben (Stocker et al. 1987). Sowohl durch die Mediatorfunktion von CO als auch durch das antioxidative Potential von Bilirubin könnte Hämoxygenase im Nervensystem unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle spielen.

1.1 Metabolismus des Häms

Alle aeroben Lebensformen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, molekularen Sauerstoff zu binden und zu transportieren. Chemische Grundlage dieser Fähigkeit sind Metalloporphyrine, die aus einer Verbindung eines Porphyrinringes mit einem katalytisch aktiven Metallion bestehen. Die bekannteste dieser Verbindungen ist das als Häm bezeichnete Ferro-(Fe²⁺)-protoporphyrin IX, das nahezu ausschließlich in Verbindung mit Proteinen als deren prosthetische Gruppe vorkommt. Diese Hämproteine sind nicht nur am Sauerstofftransport, sondern auch an verschiedenartigen anderen Transportprozessen oder an enzymatischen Auf- und Abbaureaktionen beteiligt. So dienen Hämproteine wie die Cytochrome (c, c₃, b, a, a₃) dem Elektronentransport, andere, wie Cytochrom P₄₅₀, Cytochrom Oxidase und Tryptophan-Pyrrolase, der Sauerstoff-Aktivierung. Freie Porphyrine und Metalloporphyrine hingegen kommen unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen vor. Ihnen werden Effekte bei der Regulation der Hämoglobin-Synthese (Levere & Granick 1965) oder bei der Stimulation des Wachstums von Neuriten (Ishii & Maniatis 1978) zugeschrieben.

Der weitaus größte Anteil des im Körper vorkommenden Häms ist im Hämoglobin in Erythrozyten gebunden. Bei einer durchschnittlichen Lebensdauer der Erythrozyten von etwa 120 Tagen stammen etwa 80 % des täglich abgebauten Häms aus dem Hämoglobinabbau, der Rest überwiegend aus dem Cytochrom P₄₅₀- und Myoglobin-Abbau. Insgesamt ergibt sich aus den unterschiedlichen Halbwertszeiten von Hämoglobin und Cytochrom P₄₅₀ sowie anderer Hämproteine die Notwendigkeit, etwa 1 % des gesamten Häms täglich neu zu synthetisieren. Dieser Aufbau des Häms aus δ -Aminolävulinsäure geschieht über mehrere Schritte unter Beteiligung mitochondrialer Enzyme (Maines 1992). Gleichzeitig muß jedoch eine gleich große Menge an Hämoglobin aus den eliminierten Erythrozyten abgebaut

und zu Gallenfarbstoffen umgewandelt werden (Kikuchi & Yoshida 1983). Der Abbau wird ebenfalls durch eine Folge mitochondrialer und zytosolischer Enzymreaktionen katalysiert, wobei der Hämoxygenase als erstem Enzym dieser Kaskade eine Schrittmacherfunktion zukommt (Maines 1988). Die Abfolge der Abbauschritte ist in Abbildung 1 dargestellt und läßt sich folgendermaßen beschreiben: Häm wird an Hämoxygenase gebunden, wodurch die Hämoxygenase, die im eigentlichen Sinne kein Hämprotein ist, vorübergehend zu einem Hämprotein wird. Nach Herauslösen des zentralen Eisenatoms und Spaltung der π -Methinbrücke unter CO-Freisetzung werden zwei Sauerstoffatome zwischen die Pyrrolringe A und B des Tetrapyrrolringes eingebaut. Das so entstandene lineare Biliverdin wird bei Säugetieren durch das zytosolische Enzym Biliverdinreduktase weiter zu Bilirubin reduziert und anschließend mit ein oder zwei Glukuronsäuremolekülen oder anderen Zuckern konjugiert und über die Galle ausgeschieden (Übersicht bei Maines 1992). Der biologische Nutzen des Abbaus von Biliverdin zu Bilirubin, für dessen Ausscheidung die Zuckerkonjugation erforderlich ist, liegt in den ausgeprägten Eigenschaften von Bilirubin als sehr wirksames Antioxidans (Stocker et al. 1987).

Die beim Abbau des Häms entstehenden großen Mengen an CO sind für die Sauerstofftransportfunktion des Häm- und Myoglobins nicht unproblematisch. CO besitzt eine im Vergleich zu O_2 etwa 25000-fach höhere Affinität zu Häm, die nur deshalb nicht biologisch gefährlich ist, weil die kovalente Bindung von CO an das Hämeisen durch einen distalen Histidinrest bei der Bindung des Globins an Häm in eine abgewinkelte Bindung gezwungen wird. Dadurch wird eine etwa 125-fache Verringerung der Affinität von CO erreicht, so daß eine nur noch 200-fach erhöhte Bindung von CO im Vergleich zu O_2 an Hämoglobin resultiert. Die Mengen an endogenem CO, die aus dem Hämabbau anfallen, führen damit zu einer Absättigung

von maximal 1% aller Myoglobin- und Hämoglobinbindungsstellen mit CO (Übersicht bei Maines 1992).

Neben diesem Hauptweg des Hämabbaus kann Häm auch im Zytoplasma von Hepatozyten durch Xanthin-Oxidase abgebaut werden (Cantoni et al. 1981). Bei dieser Form des enzymatischen Abbaus kommt es nicht zur Bildung von CO und Bilirubin.

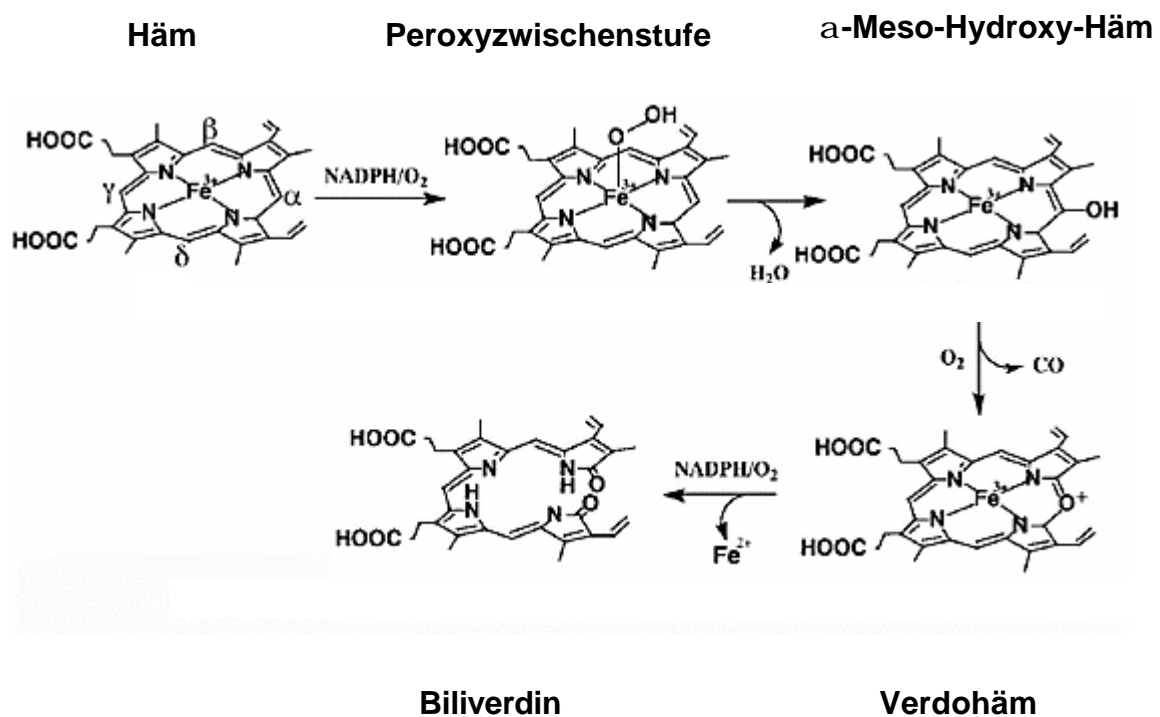


Abb. 1

Schema des Abbaus von Häm zu Biliverdin durch Hämoxxygenase (modifiziert nach Schuller et al. 1999).

1.2 Hämoxygenase (EC 1.14.99.3)

1.2.1 Biochemie, Struktur und Funktion

Der Abbau des Häms ist im Vergleich zum Syntheseweg des Häms oder zu anderen Stoffwechselwegen nicht lange bekannt. Das Enzym Hämoxygenase wurde erstmals 1968 beschrieben und der Cytochrom P450-Familie zugeordnet (Tenhunen et al. 1968). Nach der ersten Reinigung des Enzyms (Yoshida & Kikuchi 1974) wurde jedoch klar, dass Hämoxygenase ein eigenständiges Enzym ist, das Häm zu Biliverdin und Eisen unter Entstehung von CO abbaut. Aufwendigere Reinigungsverfahren brachten später den Nachweis einer zweiten Isoform (Maines et al. 1986). Das ursprünglich identifizierte Enzym mit Hauptvorkommen in Leber und Milz wurde daraufhin als Hämoxygenase 1 (HO-1) benannt, während das später entdeckte Isoenzym mit Hauptvorkommen in Gehirn und Hoden als Hämoxygenase 2 (HO-2) bezeichnet wurde. Nach Klonierung und Sequenzierung dieser beiden Isoformen wurde durch Homologie-Screening eine dritte Enzymvariante (HO-3) entdeckt, deren biochemische Charakterisierung bislang noch aussteht (McCoubrey et al. 1997).

Die Gene für HO-1 (Shibahara et al. 1989) und HO-2 (McCoubrey & Maines 1994, McCoubrey et al. 1995) sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, weisen jedoch mit 5 Exons und 4 Introns grundsätzlich eine ähnliche Struktur auf. Durch ein sehr langes Intron 1 ist jedoch das HO-2 Gen nahezu doppelt so groß wie das HO-1 Gen. Die Promotorregionen beider Gene weisen dagegen grössere Unterschiede auf. Zwar besitzen beide Gene eine TATA-like Box, beim HO-2 Gen gibt es darüber hinaus aber nur ein während der Entwicklung bedeutsames Glucocorticoid response-element (GRE). Die Promotorregion des HO-1 Gens dagegen weist mehrere regulatorisch wirksame Domänen auf (Lavrovsky et al. 1994).

Tabelle 1: Übersicht über die Isoformen der Hämoxygenase (EC 1.14.99.3).

	HO-1 (HSP 32)	HO-2	HO-3
Chromosom	22q12	16p13.3	?
Gen	Ratte: 6830 bp Mensch: ~14.000 bp 5 Exons, 4 Introns TATA-like Box Heat shock elements Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (AP1, AP2, AP4, Nf-6B) metal regulatory elements (MRE)	Ratte: 12563 bp 5 Exons, 4 Introns TATA-like Box Glucocorticoid-response element (GRE)	?
RNA	<i>Hauptvariante:</i> Ratte: 1,8 kb	<i>Hauptvarianten:</i> Ratte: 1,3 kb; 1,9 kb Mensch: 1,3 kb; 1,7 kb	<i>Hauptvariante:</i> Ratte: 2,4 kb
Protein	Ratte: 289 AS, MW 33.005 Mensch: 288 AS, MW 32.818	Ratte: 315 AS, MW 35.762 Mensch: 315 AS, MW 36.033 Kaninchen: <i>Gehirn</i> 312 AS, MW 35.352 <i>Hoden:</i> MW ~ 42.000 Ca. 40 % Homologie mit HO-1	Ratte: MW ~33.000 ca. 90 % Homologie mit HO-2
Vorkommen	<i>Induzierbar</i> Leber, Milz	<i>Konstitutiv</i> Gehirn, Hoden	<i>Konstitutiv</i> Gehirn, Hoden, Leber, Milz, Thymus, Niere, Prostata, Herz
Regulation	<i>Aktivierung durch:</i> Häm, Hitze; Neurotoxische Metalle (Cadmium) Viren, Bakterientoxine Stress: physiologisch und pathologisch <i>Normales Vorkommen:</i> Zellwachstum und Entwicklung	Keine Stimuli oder Regulatoren bekannt (Glucocorticoide nur während der Entwicklung)	Regulation nicht bekannt nur schwache Häm-katalyse

1.2.2 Kohlenmonoxid als Mediator

Die wesentliche Quelle von endogenem CO ist der Hämabbau durch Hämoxxygenase.

Die Bildung von CO beim Abbau des Häms wurde bereits 1949 beschrieben. Weiterhin entsteht CO bei der Oxidation organischer Moleküle, z.B. bei photooxidativen Prozessen, bei Autooxidationsvorgängen von Flavinoiden und Halomethanen oder bei der Lipidperoxidation von Membranen. Das Interesse an der Hämoxxygenase ging aus der möglichen Bedeutung von CO als Mediator und der Hämoxxygenase als dessen Synthesenzym hervor. Mittlerweile wird von einigen Autoren das gegenüber dem Bilirubin als Nebenprodukt angesehene CO als Hauptprodukt angesehen (Galbraith 1999).

CO hat mehrere biologische Wirkungen als Mediator. Der Wichtigste unter diesen Effekten beruht auf der Fähigkeit, die lösliche Guanylatzyklase (sGC) aktivieren zu können (Kharitonov et al. 1995). Diese Eigenschaft teilt CO mit einer Gruppe kleiner Moleküle, zu denen vor allem auch NO gehört, und die als Guanylatzyklase-aktivierende Faktoren (GAFs) zusammengefaßt werden (Schmidt 1992). Im Gegensatz zu Hämoglobin bindet Guanylatzyklase molekularen Sauerstoff nur sehr schlecht, was auf die unterschiedliche sterische Verbindung zwischen Häm und Protein zurückzuführen ist. NO bindet von allen GAFs am stärksten an die GC. Im Vergleich zu CO ist NO ein 100-fach stärkerer Aktivator der Guanylatzyklase (Friebe et al. 1996).

CO kann sowohl die GC der selben Zelle aktivieren und somit als intrazellulärer Mediator wirken, als auch in begrenztem Umfang Nachbarzellen als interzellulärer Mediator erreichen. Die Wirkungen sind dabei für verschiedenste Organsysteme gezeigt worden. So wurde CO als Mediator im Nervensystem beschrieben und als Faktor, der an der endothel-abhängigen Gefäßrelaxation wesentlich beteiligt ist

(Zakhary et al. 1996). Die Lokalisation von HO-2 entspricht dabei häufig der von löslicher GC (Zakhary et al. 1996).

Zu den weiteren biologische Effekten, die für CO beschrieben wurden, zählt die inhibitorische Wirkung auf Cytochrom P450-Enzyme (an der Biosynthese von Steroidhormonen beteiligt; Raff & Jankowski 1994) und Effekte auf Kalium-Kanäle (Prabhakar et al. 1995).

1.2.3 Bilirubin als Antioxidans

Als zweites Produkt entsteht aus dem Hämabbau Biliverdin, das mittels des Enzyms Biliverdin-Reduktase (BVR) unmittelbar weiter in seine reduzierte Form Bilirubin überführt wird. Biliverdin ist sehr gut wasserlöslich und kann somit leicht über die Niere ausgeschieden werden. In der Phylogenese ist daher bis hin zu Reptilien und Vögeln Biliverdin tatsächlich Endprodukt des Hämabbaus. Bilirubin hingegen muß an Serumalbumin gebunden zur Leber transportiert werden und erhält dort durch Konjugation seiner Propionatseitenkette mit zwei solubilisierend wirkenden Glucuronat-Zuckeresten eine höhere Wasserlöslichkeit. Das entstandene Bilirubindiglucuronid kann nun über die Galle ausgeschieden werden.

Der Grund, weshalb Säugetiere diesen erheblichen Aufwand betreiben und Biliverdin zu dem weitaus schlechter löslichen Bilirubin reduzieren, liegt wahrscheinlich in dessen erheblichem antioxidativen Potential. Freies Bilirubin sowie an Albumin gebundenes Bilirubin haben eine antioxidative Wirkung, indem Bilirubin zwei Hydroperoxidradikale einfangen kann. Es wird dabei zu Biliverdin oxidiert und rasch wieder über das Enzym BVR zu Bilirubin reduziert. Als Schutz vor wasserlöslichen Peroxiden besitzt albumingebundenes Bilirubin etwa ein Zehntel der Wirksamkeit des Ascorbats (Vitamin C). Neuzil und Stocker (1993) zeigten, dass Bilirubin sein Trägerprotein Albumin vor oxidativen Schäden durch HO- Radikale

schützt. Dieses macht sich durch Reduktion von carbonylierten Proteinen bemerkbar (Neuzil & Stocker 1993). Für Lipoproteine und in Membranen ist freies Bilirubin durch seine Wasserunlöslichkeit ein sehr potentes Antioxidans und kommt in dieser Beziehung dem Vitamin E nahe. Es ist wirksamer als das wasserlösliche Vitamin E-Analogon Trolox (Farrera et al. 1994). Bilirubin ist *in vitro* die potenteste der bis heute bekannten endogenen antioxidativen Substanzen. Auch *in vivo* stellt sich Bilirubin als äußerst effektives physiologisches Antioxidans dar. Dabei steigt die Potenz von freiem Bilirubin und an Albumin gebundenem Bilirubin als Peroxidradikalfänger bei sinkendem pH-Wert (Stocker et al. 1987). So zeigte sich bei Patienten mit leicht erhöhten Bilirubinwerten im Vergleich zu einer Vergleichsgruppe mit Normalwerten eine Senkung des Risikos einer koronaren Herzkrankheit (KHK) (Hopkins et al. 1996). Dieser protektive Effekt ist vergleichbar mit dem einer HDL-Cholesterinerhöhung. Langjähriger Zigarettenkonsum senkt signifikant den Bilirubinspiegel im Blut, was wiederum mit dem Risiko an einer KHK zu erkranken in Zusammenhang gebracht werden kann.

Unter diesem Aspekt betrachtet könnte auch die vorübergehende Hyperbilirubinämie bei Neugeborenen einen Schutz gegenüber oxidativem Stress bei noch nicht vollständig ausgebildeten anderen antioxidativen Systemen bedeuten. Dennerly und Mitarbeiter (1995) zeigten, dass neugeborene Gunn-Ratten mit erhöhten Bilirubinwerten im Vergleich zu neugeborenen Gunn-Ratten mit normalen Bilirubinwerten signifikant niedrigere Serumspiegel an thiobarbituratsäurereaktiven Substanzen, Lipidhydroperoxiden und Proteincarbonylgehalt aufweisen (Dennerly et al. 1995). Dabei waren alle anderen Serumwerte für antioxidative Substanzen, wie Superoxiddismutase, Katalase, Gluthathion, Vitamine A, C und E sowie der Harnsäurespiegel bei den ikterischen Ratten nicht erhöht und mit den nicht-ikterischen Ratten vergleichbar (Dennerly et al. 1995).

Diese Beispiele zeigen, dass dem Bilirubin eine wichtige Funktion als endogener Zellschutz zukommen könnte, insbesondere in Geweben, die oxidativen Belastungen gegenüber empfindlich sind, wie zum Beispiel im Myokard (Wu et al. 1991) und im Nervengewebe (Ewing et al. 1992).

Eine weitere Funktion kommt Bilirubin als antimutagenem Wirkstoff zu. Bilirubin blockiert direkt die Mutagenität von 4-Nitroquinolin-1-oxid (4-NQO) in TA100-Stämmen von *Salmonella typhimurium* (De Flora et al. 1994). Auch bezüglich dieses antimutagenen Effektes weist Bilirubin im Vergleich zu Biliverdin eine wesentlich stärkere Wirkung auf, die durch dessen besseres Erreichen des Zellkerns zu erklären ist.

Zu den in letzter Zeit entdeckten physiologisch bedeutsamen Eigenschaften des konjugierten Bilirubins und Biliverdins zählen auch deren Wirkungen auf komplementabhängige Reaktionen (Nakagami et al. 1993). Biliverdin und vor allem Bilirubin können eine Blockade der Komplementkaskade auf der C1-Stufe bewirken.

Die Vielfalt der hier angegebenen Beispiele zeigt, dass als klassische Abfallprodukte geltende Substanzen wie CO und Bilirubin, die lange Zeit als nutzlos und sogar giftig angesehen wurden, durchaus wichtige physiologische Bedeutung haben können.

1.3 Hämoxygenasen im Nervensystem

Seit längerer Zeit war bekannt, daß der Hämabbau vorwiegend in der Leber und der Milz stattfindet. Überraschenderweise wurde dann aber auch Hämoxygenaseaktivität, die später der HO-2 zugeschrieben werden konnte, im Nervengewebe nachgewiesen. Der Anstieg des Hämabbauproduktes Bilirubin im Nervensystem bei Neugeborenen auf Werte $> 0,15$ g/l führt aufgrund der geringen

Wasserlöslichkeit zu schädigenden Einlagerungen in Nervenzellen der Basalganglien. Die Hemmung des Hämabbaus in Leber und Milz könnte daher auch für das Nervensystem beim Ikterus neonatorum eine protektive Wirkung haben. Wie oben bereits ausgeführt, könnte die physiologische Hyperbilirubinämie des Neugeborenen Bedeutung als antioxidativen Schutz haben (Valaes et al. 1994).

Als 1986 Hämoxygenaseaktivität im Gehirn nachgewiesen wurde (Maines et al. 1986), war die Funktion noch unklar. Es wurde spekuliert, dass im Gehirn eine konstitutive Expression der HO-2 für die Homöostase nötig sei, während die induzierbare Isoform HO-1 Anpassungen an die wechselnden inneren und äußeren Umgebungsbedingungen gewährleistet (Maines 1988).

Das breite Interesse an Hämoxygenasen im Nervengewebe erwachte jedoch erst mit der Entdeckung, dass das Nebenprodukt des Hämabbaus CO ein Mediator sein kann (Maines et al. 1986). CO als neuronalem Botenstoff wird eine wichtige Funktion in der Langzeitpotenzierung zugeschrieben, hier finden wichtige Prozesse wie Gedächtnisbildung und Lernen statt (Shinomura et al. 1994, Zhuo et al. 1998).

Blockiert man Hämoxygenasen z.B. mit Zinkprotoporphyrin (ZnPP), wird die Induktion von Langzeitpotenzierung verhindert. Dabei muss allerdings angemerkt werden, dass die Verwendung von ZnPP IX zu einer Hemmung aller drei Isoformen des Enzyms führt. Ausserdem hat ZnPP IX auch hemmende Wirkungen auf die Guanylatzylase und die NO-Synthasen (Serfass & Burstyn 1998). Die Berichte, dass beide Mediatoren, CO und NO, alleine oder ergänzend als retrograde Botenstoffe durch Stimulation der abhängigen Proteinkinase durch sGC und zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) in der CA1 Region des Hippocampus (Hawkins et al. 1994) wirken, müssen daher kritisch betrachtet werden.

1.4 Fragestellung und Ziel

Während die Bedeutung der Hämoxxygenasen im Zentralnervensystem relativ gut untersucht ist, liegen nur wenige Angaben über deren Verteilung und mögliche Funktion im peripheren Nervensystem vor. In der vorliegenden Arbeit sollten am Nervus ischiadicus der Ratte und des Meerschweinchens als Modell für periphere Nerven folgende Fragen beantwortet werden:

- Werden die beiden wesentlichen Isoformen der Hämoxxygenase, HO-1 und HO-2, im Nervus ischiadicus exprimiert?
- Wie sind diese Isoformen der Hämoxxygenasen im Nervus ischiadicus unter normalen Bedingungen verteilt?
- Wie verändert sich die Expression und Verteilung der Isoformen nach Läsion des Nervus ischiadicus durch Quetschung?

Die Beantwortung dieser Fragen hat als Ziel, strukturelle Grundlagen zur Klärung der Bedeutung der Hämoxxygenasen in peripheren Nerven unter normalen und unter pathologischen Bedingungen zu liefern.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die untersuchten Gewebe wurden von Meerschweinchen (Harlan-Winkelmann, Borcheln, n = 19) und Wistar-Ratten (Tierstall des Physiologischen Instituts, Universität Giessen; n = 12) entnommen. Bis zur Tötung und Gewebeentnahme wurden die Tiere unter Standardlaborbedingungen (12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, Wasser und Futter *ad libitum*) gehalten.

Die Entnahme der Gewebe erfolgte nach Tötung der Tiere durch CO₂-Intoxikation.

2.1.2 Nervenquetschung in Organkultur

Reagenzien

- Eagle's minimum essential medium (MEM-21011, GIBCO, BRL, Paisley, UK)

Um den axonalen Transport von Hämoxygenasen nachzuweisen, wurden Organkulturen des Nervus ischiadicus angelegt. Nach Tötung der Meerschweinchen und Wistarratten wurde die Entnahmenstelle am dorsalen Oberschenkel mit Alkohol (70 %) desinfiziert und unter einer sterilen Werkbank (Heraeus, Hanau) mit einem Einmalskalpell die Haut vom Os sacrum bis zum Kniegelenk geöffnet und mit desinfizierten Instrumenten wurde die dorsale Oberschenkelmuskulatur durchtrennt

und der Nervus ischiadicus ohne Berührung dargestellt. Die Berührung des Nerven erfolgte nur an den Entnahmestellen am Os sacrum und des Bereichs der Aufteilungsstelle in den Nervus tibialis und Nervus fibularis. Der so entnommene Nerv (Länge ca. 3 cm) wurden in minimum essential medium mit Zusatz überführt. Mit Minutien wurden die Organpräparate auf Dentalwachsplatten aufgespannt. Von den beiden entnommenen Nerven pro Tier wurden bei einem Quetschungen mit einer feinen Pinzette im Abstand von ca. 5 mm gesetzt, während der andere Nerv als unlädierte Kontrolle diente. Beide wurden schwimmend in MEM, das über eine Pasteurpipette mit einem Gasmisch (95 % O₂, 5 % CO₂) begast wurde, bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die kultivierten Nerven wurden anschließend wie die frisch entnommenen Gewebe weiterbehandelt.

2.1.3 Gewebebearbeitung

Reagenzien

- Natriumphosphatpuffer (0,2 M; Merck, Darmstadt):
Stammlösung A: 27,6 g NaH₂PO₄ x 1 H₂O in 1000 ml Aqua destillata (a.d.)
Stammlösung B: 35,6 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O in 1000 ml Aqua destillata (a.d.)
115 ml Lsg. A + 385 ml Lsg. B ergeben 500 ml Phosphatpuffer 0,2 M, pH = 7,4
- Zamboni-Lösung:
150 ml gesättigte Pikrinsäure (Merck)
50 ml Formaldehyd (37%; Roth, Karlsruhe)
500 ml Natriumphosphatpuffer (0,2 M)
350 ml a.d.
- Saccharose-Lösung:
18 % Saccharose (Merck) in 0,1 M Na-Phosphatpuffer

Durchführung

Für die weiteren Untersuchungen wurden folgende Gewebe entnommen: Nervus ischiadicus, Rückenmark, Gehirn, Spinalganglien, Hoden, Leber, Milz. Für die immunhistochemischen Untersuchungen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene wurden die entnommenen Gewebe in Zamboni-Lösung für 4-6 h bei 4°C fixiert und anschließend mindestens dreimal für zwei Stunden in 0,1 M Na-Phosphatpuffer gewaschen. Zur Kryoprotektion wurden die Proben anschließend über Nacht in die Saccharose-Lösung überführt, in Gefriereinbettmedium Tissue Tek (Vogel, Gießen) auf Filterpapier aufgebracht und in Stickstoff-gekühltem Isopentan (Riedel-de Haen) schockgefroren. Zuvor wurde der Nerv auf die Länge von ca. 1 cm zugeschnitten, um somit entweder senkrecht oder waagrecht in Tissue Tek eingefroren werden zu können.

Für biochemische Untersuchungen entnommene Gewebe wurden direkt in sterile Schraubdeckelgefäße aus Kunststoff überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Alle Gewebe wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C aufbewahrt.

2.2 Methoden

2.2.1 Lichtmikroskopische Immunhistochemie

2.2.1.1 Einfache Immunfluoreszenz

Reagenzien

- Chromgelatine
Kaliumchromsulfat-12-Hydrat (Riedel-de Haen, Seelze)
- Phosphate buffered Saline (PBS)
8 g Natriumchlorid (Roth)
200 mg Kaliumchlorid (Roth)
1,44 mg Kaliumdihydrogenphosphat (Roth)
240 mg Kaliumdihydrogenphosphat (Roth)
ad 1 l aqua dest., pH 7,4
0,1 M Phosphatpuffer mit 0,9 % NaCl
- Blocklösung:
10% normales Schweineserum (Schlachthof Giessen, hitzeinaktiviert)
0,1% Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg)
0,5% Tween 20 (Atlas Chemical Industries Inc., USA)
in PBS (0,1 M Na-Phosphatpuffer mit 1,8 % NaCl)
- Primärantikörper
gemäß der angegebenen Verdünnung (s. Tabelle 2) in PBS mit 1,8% NaCl
- Sekundäre Immunreagenzien
sekundäre Antiseren mit Fluorochrom- oder Biotin-Markierung (s. Tabelle 3) in PBS mit 1,8% NaCl
- Natriumchloridpuffer
1,8 % NaCl (Roth)
in 0,1 M Na-Phosphatpuffer
- Gepuffertes Glycerol
2 Teile Glycerol (Merck), wasserfrei
1 Teil Natriumkarbonatpuffer (Roth; 0,5 M, pH=8,6)

Durchführung

Es wurde die Technik der indirekten Immunfluoreszenz gewählt, bei der im Gegensatz zur direkten Immunfluoreszenz der Primärantikörper nicht mit einem Fluorochrom markiert ist. Dadurch wird eine größere Sensitivität und eine höhere Flexibilität beim Einsatz der Detektionssysteme ermöglicht.

Gefrierschnitte mit einer Dicke von 8 µm wurden am Kryostat (Leica Modell 1900M, Nussloch; Boxtemperatur –20°C, Präparatetemperatur –25°C) angefertigt und auf mit Chromalaun/Gelatine beschichtete Objektträger aufgenommen. Nach einer Stunde Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit einem Fettstift umfahren. Die immunhistochemische Inkubation begann mit der Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen (Hauri & Bucher, 1986) durch eine eiweissreiche Blocklösung mit Zusatz des Detergens Tween 20 (eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer).

Nach Absaugen der Blocklösung wurde der Primärantikörper (Menge ca. 20 µl pro Schnitt, Verdünnung s. Tabelle 2) in ausgetesteter Verdünnung aufgetragen. Die Primärantikörper sind gelöst in PBS/NaCl (PBS in doppelter Salzkonzentration zur Verringerung der Hintergrundreaktion; (Grube & Weber 1980). Die Schnitte wurden über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Schnitte dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Flüssigkeitsrest abgesaugt und der Sekundärantikörper aufgetragen

Tabelle 2. Liste der verwendeten Primärantikörper.

Antigen	Spezies	Verdünnung	Code/ Charge	Quelle
HO-1 (AS 12-25) Synthetisches Peptid DLSEALKEATKEVHC	Kaninchen	1:200	HC 3001	Affiniti, Mamhead, GB
HO-2 gereinigtes Protein aus Rattenhoden	Kaninchen	1:1600	904408	StressGen, Victoria, Kanada
HO-2 (AS 246-264) Synthetisches Peptid ETLEDGFPVHDGKGDMRKC	Kaninchen	1:400	HC 3002	Affiniti
PGP 9.5 gereinigtes Protein aus menschlichem Gehirn	Maus	1:200	31A3	UltraClone Isle of Wight, GB
Substanz P Synthetisches Peptid RPKPQQFFGLM	Maus	1:600	SP 31	Dr. J.Y. Couraud, Gif-sur-Yvette, F
Vimentin gereinigtes Protein aus Schweineaugenlinsen	Maus	1:800	Clone V9	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 3. Liste der verwendeten Sekundärantikörper und Immunreagenzien.

Sekundärantikörper				
<i>Antigen</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Wirtsspezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Quelle</i>
Kaninchen-IgG	Fluorescein- Isothiocyanat (FITC)	Ziege	1:500	Organon Teknika, Eppelheim
Maus-IgG	FITC	Ziege	1:500	Cappel, Eppelheim
Kaninchen-IgG	Biotin	Schaf	1:100	Amersham- Buchler, Braunschweig
Maus-IgG	Biotin	Schaf	1:50	Amersham- Buchler
Kaninchen-IgG	Indocarbocyanin (Cy 3)	Ziege	1:250	Dianova, Hamburg
Tertiärreagenz				
<i>Erkanntes Molekül</i>	<i>Konjugat</i>	<i>Bindendes Molekül</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Quelle</i>
Biotin	Texas-Rot	Streptavidin	1:200	Amersham-Buchler

Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper (eine Stunde bei Raumtemperatur in feuchter Kammer) wurde erneut dreimal für zehn Minuten mit PBS gespült. Wurde der biotinilierte Sekundärantikörper verwendet, erfolgte nach Absaugen der Flüssigkeit nun die einstündige Inkubation mit dem Streptavidin Texas-Rot Komplex (Raumtemperatur, feuchte Kammer, Dunkelheit) und erneutes Waschen für dreimal zehn Minuten in PBS bei Dunkelheit. Alle Schnitte wurden mit gepuffertem Glycerol als Medium eingedeckt und bei Dunkelheit aufbewahrt.

2.2.1.2 Spezifitätskontrollen

Kontrollen auf unspezifischen Bindungen wurden durch eine Präabsorption der HO-2-Antiseren über Nacht bei 4° C mit korrespondierendem HO-2-Protein (Konzentration: 20 µg Antigen/ml Antiserum in Endverdünnung) durchgeführt. Danach erfolgte die weitere immunhistochemische Bearbeitung wie oben beschrieben. Eine Positivkontrolle ohne Antigengabe wurde mitgeführt.

Als weitere Kontrollen wurde der Primärantikörper unter Beibehaltung aller anderen Schritte ausgelassen, um somit unspezifische Bindungen durch die Sekundärantikörper nachzuweisen

2.2.1.3 Doppelimmunfluoreszenz

Zur simultanen Darstellung von zwei Antigenen in einem Schnitt wurden Doppelimmunfluoreszenzverfahren durchgeführt. Das grundsätzliche Vorgehen entspricht dabei den unter 2.2.1.1 angegebenen Schritten. Anstelle eines einzelnen Primärantikörpers wurde ein Gemisch aus den jeweiligen Primärantikörpern (aus unterschiedlichen Spezies, Endkonzentration entspricht dem jeweiligen Verdünnungsoptimum bei einfacher Immunfluoreszenz) gemeinsam auf den Schnitt aufgetragen. Zur Detektion wurde zunächst der biotinierte Sekundärantikörper

alleine eingesetzt und anschließend die Inkubation mit einem Gemisch aus dem FITC-markierten Sekundärantikörper und dem Streptavidin-Texas-Rot-Komplex durchgeführt.

2.2.1.4 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Modell BX60F, Hamburg). Die geeigneten Filterkombinationen, die zur Auswertung der Einfach- und Doppelimmunfluoreszenzen verwendet wurden, sind in Tabelle 4 angegeben.

Tab. 4. Verwendete Filterkombinationen

<i>Fluorochrom</i>	<i>Filtermodul</i>	<i>Anregungsfilter</i>	<i>Sperrfilter</i>
FITC	U-NIBA	470 nm - 490 nm	515 nm - 550 nm
Texas-Rot	U-MWIY	545 nm - 580 nm	610 nm longpass
UV-Filter	U-MNUA	390 nm - 450 nm	475 nm longpass
Cy-3	U-M41007A	525 nm - 560 nm	570 nm - 650 nm

Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte fotografisch über eine am Mikroskop angeschlossene Fotoeinrichtung. Für Schwarz/Weiss-Aufnahmen wurden 400 ASA-Filme (Kodak TMY 400) und für Farbdiaspositive 64 ASA-Filme (Agfa EPY 64) verwendet.

Zusätzlich wurden die mikroskopischen Bilder mit einem Videodokumentationssystem (Scion-Image, Jena) als TIFF-Dateien gespeichert. Diese Bilder wurden mit einer Bildverarbeitungssoftware (Adobe Photo-Shop 2.0) nachbearbeitet und über einen Fotodrucker (Codonics Modell NP-1660M) ausgegeben.

2.2.2 Elektronenmikroskopie

Reagenzien

- Tris-HCl 1 %
Lösung A: 121,1 g TRIS (Merck) in 1 l a.d.
Lösung B: 1 N HCl
75 ml Lösung A und 60 ml Lösung B mit a.d. auf 1,5 l auffüllen
- OsO₄ 1%
1% Osmium-Tetroxid (Merck) in a.d. lösen
- Maleatpuffer
Lösung A: 23,2 g Maleinsäure (Merck) in 200 ml 1 N NaOH lösen, mit a. d. auf 1 l auffüllen.
Lösung B: 0,2 N NaOH
50 ml Lösung A und 7,2 ml Lösung B mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen, ergibt 0,05M Maleatpuffer (pH 5,2)
50 ml Lösung A und 26,9 ml Lösung B mit Aqua dest auf 200 ml auffüllen, ergibt 0,05 M Maleatpuffer (pH 6,0)
- Uranylacetat-Lösung
1% Uranylacetat (Merck) in Maleatpuffer (pH = 6,0) frisch ansetzen. Lösung für 10 min bei 13.000 U/min zentrifugieren und lichtgeschützt aufbewahren.
- Ethanol-Lösung
70 ml Ethanol unvergällt (Merck), 30 ml Aqua dest.
- Ethanol (70%)/Propylenoxid-Lösung
Ethanol-Lösung mit 50 % Propylenoxid (Merck) versetzen
- Kunststoffeinfbettung
24 g Epoxipropylether des Glycerins (Glycidether 100; vormals Epon 812; Roth)
17 g MNA1-Methyl-5-norbornen-2,3-dicarbonsäureanhydrid
Methylnadicanhydrid (Härter MNA; Roth)
8g DDSA 2-Dodecenylbersteinsäureanhydrid (Härter DBA; Roth)
1g 2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl)-phenol (Beschleuniger DMP-30, Roth)
- Teflonierte Deckgläser und Objektträger
Objektträger und Deckglaschen mit Teflonspray unter dem Abzug einsprühen und trocknen lassen.
- Cyanacrylat-Sekundenkleber Technicoll (Beiersdorf, Hamburg)

Durchführung

Es wurden von längs oder quer in Tissue-Tek eingebetteten Nn. ischiadici, die zuvor für die immunhistochemische Untersuchung mit Zambonis Lösung fixiert worden waren, Gefrierschnitte (40 μ m) angefertigt, in Tris-HCl-Lösung überführt und anschliessend unter dem Abzug in einer 1 % Osmium-Tetroxid Lösung in einer feuchten Kammer für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Maleatpuffer wurden die Schnitte in 1 % Uranylacetat-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtschutz kontrastiert. Nach erneutem Waschen in Maleatpuffer (pH = 5,2) wurden die Proben zur Entwässerung für jeweils 10 min in Ethanol (70 %), Ethanol (70%)/Propylenoxid-Lösung (1:1), reinem Propylenoxid und Propylenoxid-Epon-Gemisch inkubiert und anschließend für 1 h in reines Epon überführt. Die Schnitte wurden in einem Tropfen Epon auf einem teflonierten Objektträger ausgebreitet, mit einem teflonierten Deckglas eingedeckt und unter Beschwerung mit Bleigewichten bei 60°C im Trockenschrank ausgehärtet.

Unter einem Lichtmikroskop wurden die interessanten Stellen für die weitere Bearbeitung ausgewählt. Nach Entfernen des Deckgläschens wurden die Areale mit einer Klinge ausgeschnitten und mit Cyanacrylat-Sekundenkleber auf einen Epon-Block aufgeklebt. Ultradünne Schnitte (70-90 nm) wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Nussloch) angefertigt und auf Grids aufgenommen.

Die Auswertung der Schnitte erfolgte mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop (Modell EM 902, Zeiss, Jena).

2.2.3 Biochemische Arbeitstechniken

2.2.3.1 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese)

Reagenzien

- Acrylamidlösung (30%)
292 g Acrylamid (Serva)
8 g Bisacrylamid (Serva)
ad 1 l a. d., Zugabe von Amberlite (Roth), 1 h rühren lassen, filtern
- Trenngelpuffer (Puffer A)
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 (Gerbü, Heidelberg)
0,4 % Natrium-dodecylsulfat (SDS; Serva)
- Sammelgelpuffer (Puffer B)
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) (Gerbü)
0,4 % SDS (Serva)
- Ammoniumpersulfat (APS), 10% (Roth)
- N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED), (Roth)
- Elektrophoresepuffer (Laufpuffer)
125 mM Tris-HCl (Gerbü)
960 mM Glycin (Roth)
0,5 % SDS (Serva)
- Protein-Probenpuffer
62,5 mM Tris-HCl (Gerbü)
10 % Glyzerin (87%; Roth)
2 % SDS (Serva)
1 % 2-Mercaptoethanol (Fluka AG, Buchs, CH)
0,25 % Bromphenolblau (Sigma, Deisenhofen)
- SDS-Page-Molekulargewichtsstandard (Sigma)
- Blue Marker
0,1 % Coomassie Brilliant Blue G (Sigma)
- Trenngelansatz (12 %)
8 ml Acrylamidlösung (30 %)
2 ml aqua dest.
10 ml Trenngelpuffer
130 µl APS (10 %) (Roth)
15 µl TEMED (Roth)

- Sammelgelansatz
1,25 ml Acrylamidlösung
3,75 ml aqua dest.
5 ml Sammelgelpuffer
130 µl APS (10 %) (Roth)
15 µl TEMED (Roth)

Durchführung

Es wurden 12 %-ige Vertikalgele mit einer Dicke von 1 mm gegossen. Als Gussformen wurden zwei mit Klammern zusammengehaltenen Glasplatten verwendet, die sich durch Spacer in einem definierten Abstand zueinander befanden. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und in noch flüssigem Zustand vorsichtig mit a. d. überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das a. d. abgekippt und das noch flüssige Sammelgel appliziert. Pro Kammer wurde ein Gelkamm eingesetzt und nach der Polymerisation des Sammelgels wieder entfernt. Die Klammern wurden geöffnet, der Spacer entfernt und das zwischen den Glasplatten befindliche Gel in eine Gelkammer eingesetzt, welche mit Laufpuffer gefüllt war. Unter Vermeidung von Luftblasenbildung wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Als Marker dienten der SDS-Page Molekulargewichtsstandard und der Blue Marker als visuelle Laufkontrolle. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V (Power Supply Model 493, ISCO, Lincoln, NE, USA) bis zur gewünschten Laufstrecke (ca. 1 h).

2.2.3.2 Proteinpräzipitation

Reagenzien

- Homogenisierungspuffer
PBS plus Proteinaseinhibitoren:
10 µl Pepstatin A (Endkonzentration: 2 µM, Sigma)
10 µl Leupeptin (Endkonzentration: 2 µM, Sigma)
10 µl Pefabloc (Endkonzentration: 200 µM, Sigma)
40 µl EDTA (0,25 M; Endkonzentration: 1 mM, Sigma)

Vor Herstellung des Gewebeextrakts wurde das Feuchtgewicht der folgenden schockgefrorenen Gewebe bestimmt: Nervus ischiadicus (Kontrolle und nach Organkultur, jeweils mit und ohne Quetschung) und Spinalganglien des Meerschweinchens und der Ratte. Gewebeproben mit einem Gewicht von ca. 120-150 mg wurden mit eisgekühltem Homogenisierungspuffer im Verhältnis 1:5 (Gewebegewicht/Puffervolumen) versetzt. Anschließend wurden die Proben mechanisch homogenisiert und bei 2500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet verworfen. Nach weiterer Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge für 30 Minuten bei 14000 U/min wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) vom Pellet (membranständigen Fraktion) getrennt. Überstand und Pellet wurden im Verhältnis 1:2 mit Probenpuffer versetzt und für 10 min. gekocht. Die Aufbewahrung der Proteinfractionen erfolgte in Aliquots bei -20°C .

2.2.3.3 Proteinquantifizierung nach Bradford

Um eine Beladung des Gels mit gleichmäßigen Proteinmengen zu gewährleisten, ist eine Proteinbestimmung im gewonnenen Homogenisat erforderlich. Für die photometrische Messung der Proteinkonzentration wurden Leerproben, Standardproben und Messproben in einem Volumen von jeweils 1 ml in Plastikkuvetten pipettiert. Als Leerproben diente der Puffer (PBS plus Proteinaseinhibitoren). Mit dem Standard-Bradford-Reagenz und Rinderserumalbumin-Lösung (BSA; 1 mg/ml in a.d.), wurde eine Standardproben-BSA-Verdünnungsreihe gebildet. Der für die Messproben erwartete Messbereich wurde abgedeckt und lag meist zwischen 10 und 250 $\mu\text{g/ml}$ BSA. Es erfolgte die Kalibrierung des Photometers (Spektralphotometer U-2000, Hitachi) bei einer

Wellenlänge von 595 nm. Von allen Proben wurden Doppelwerte bestimmt. Zu sämtlichen Proben wurde je 1 ml Coomassie Protein-Assay-Reagenz zugegeben, gemischt und für die Ausbildung des Farbumschlags 10 min stehengelassen. Die sich zur Proteinkonzentration proportional verhaltende Farbintensität wurde photometrisch bei 595 nm gemessen. Aus der bestimmten Extinktion und dem Verdünnungsfaktor der Proteinlösung wurde die Proteinkonzentration der Proben berechnet. Für das Trenngel wurde jeweils eine Proteinmenge von 20 µg als äquivalentes Probenvolumen aufgetragen.

2.2.3.4 Western Blot

Reagenzien

- Methanol (Roth)
- Kathodenpuffer
 - 25 mM Tris-Base (Roth)
 - 40 mM 6-Aminohexansäure (Roth)
 - 20 % Methanol (Roth)
- Anodenpuffer I
 - 30 mM Tris-Base (Roth)
 - 20 % Methanol (Roth)
- Anodenpuffer II
 - 300 mM Tris-Base (Roth)
 - 20 % Methanol (Roth)
- Ponceau S
 - 400 mg Ponceau S (Roth)
 - 100 ml Essigsäure (Roth)
 - ad 1 l a. d., steril filtrieren
- Entfärber
 - 7,5 % Essigsäure (Roth)
 - 25% Methanol (Roth)

- 10 x Tris-buffered saline (TBS)
12,1 g Tris-Base (Roth)
87,1 g Natriumchlorid (Roth)
ad 1 l a. d., pH = 7,4
- Tween 20 (Atlas Chemical Industries Inc., USA)

Durchführung

Die im Western Blot eingesetzten Proteine wurde zunächst in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.1). Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Sammelgel erfolgte auf eine Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P Typ PVDF, Millipore) mittels Transblotting. Das Anodenblech der Blotkammer (Trans-Blot Semi-Dry, Bio-Rad), wurde erst mit einem a. d. getränkten Tuch angefeuchtet, dann wurden vier mit Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere (3 M Whatmann, Schleicher und Schuell) und vier in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere auf die Anode gelegt. Darauf wurde die Zellulosemembran gelegt, die vorher kurz mit Methanol und mit aqua dest. gespült wurde und mindestens für 10 min im Kathodenpuffer lag. Auf die Membran wurde unter Vermeidung von Lufteinschlüssen das Gel gelegt, welches ebenfalls zuvor mindestens 10 min in Kathodenpuffer gelegen hatte. Zum Schluss wurden vier in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere aufgelegt und der Kathodendeckel der Blotkammer geschlossen. Unter Anlegung eines elektrischen Feldes (Electrophoresis Power Supply Model 493, ISCO) mit 0,8 mA pro cm² wurde für eine Stunde geblottet. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran 30 s lang in Ponceau S und dann 3 min in den Entfärber gelegt, um die Proteinbanden anzufärben um somit die Transfereffizienz zu dokumentieren. Anschließend wurde die Membran mit TBS plus 0,05 % Tween 20 (TBST) abgespült, in TBST luftdicht verpackt und bei 4° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.2.3.5 Immuninkubation und chemische Detektion der Proteine

Reagenzien

- TBS (10-fach)
12,11 g Tris-Base (Roth)
87,66 g NaCl (Roth)
800 ml a. d.
pH 8,0 mit HCl einstellen
- TBST (1-fach)
100 ml TBS (10x)
0,5 ml Tween 20
ad 1000 ml a. d.
- Tween 20 (Roth)
- Magermilchpulver (Uelzena, Uelzen)
- 1. Antikörper
HO-1/HO-2 (siehe Tab. 1)
- 2. Antikörper, anti-Kaninchen IgG (Amersham, Buckinghamshire, GB), biotinyliert (siehe Tab. 2)
- Alkalische Phosphatase-Puffer (AP-Puffer, pH 9,5)
1,21 g Tris-Base
0,585 g NaCl
0,102 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) (Merck)
ad 100 ml a. d.
- Chemische Detektion
Streptavidin-AP-Konjugat (Boehringer, Mannheim)
- Substratlösung
10 ml alk. Phosphatase Puffer (Boehringer)
200 μl Nitroblue-Tetrazolium/BCIP (Boehringer)

Durchführung

Zur Blockade unspezifischer Proteinbindungen wurde die Nitrozellulose-Membran (Immobilon-P Typ PVDF, Millipore) in 5% Magermilch/TBST eine Stunde bei Raumtemperatur gelegt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primäriserumgemisch HO-1/HO-2 III (s. Tab. 1) mit einer Verdünnung von 1:5000

bzw. 1:7500 in 2,5% Magermilch/TBST über Nacht bei +4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen à 10 min in TBST die Membran für zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper, einem biotinylierten Anti-Kaninchen IgG (Verdünnung 1:7500), überschichtet. Es erfolgten drei Waschgänge in TBST für 10 min, danach wurde mit einer hühnereiweissavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase (Verdünnung 1:3000) eine Stunde inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen in TBST und einmaligem in TBS jeweils für 10 min. erfolgte die Entwicklung mit Nitroblue-Tetrazolium/BCIP-Substrat in AP-Puffer. Nach ca. zwei Minuten unter ständigem Schwenken konnte man den Farbumschlag auf der Nitrozellulosemembran erkennen und somit mit dem Antikörper markierte Proteine detektieren.

2.2.4 Reverse Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR)

2.2.4.1 Material siehe 2.1.1

2.2.4.2 RNA-Isolierung

Reagenzien aus RNEasy-Kit (Qiagen, Heiden)

- Gewebelysispuffer (ATL-Puffer)
- Waschpuffer (AW-Puffer)
- Elutionspuffer (AE-Puffer)
- Proteinase K-Stammlösung
- QIAamp Spin Säule mit 2 ml Tube
- RNase (Sigma)
- Ethanol 96% (Merck)

Durchführung

Die RNA wurde aus 24-Stunden kultiviertem Nervus ischadicus der Ratte gewonnen, hierbei wurden sowohl unbehandelte als auch gequetschte Nerven verwendet. Als Kontrolle diente Rattenhirn. Die Homogenisierung der Zellen wurde mit dem QIAshredder des RNA-Isolierungs-Kits durchgeführt. Zunächst wurde das Gewebe abgewogen, gemörsert und mit Guanidinisothiocyanat- und β -Mercaptoethanol-haltigem Puffer lysiert. Die Isolierung der RNA aus den homogenisierten Zellen erfolgte mittels Rneasy spins (Qiagen), indem eine hohe Konzentration chaotropher Salze über eine Silicagelmatrix die verschiedenen Zellphasen durch Zentrifugation separiert. Nach Elution der RNA mit autoklaviertem a. d. wurde die RNA mit Isopropanol präzipitiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte in Ethanol (70 %) und Aufnahme in a. d.

1 μ g der isolierten RNA wurde auf einem Agarosegel (1%) zur Qualitätsbestimmung elektrophoretisch getrennt. Die Quantifizierung erfolgte

photometrisch bei 260 nm (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, GB). Die isolierten RNAs wurden nach Zugabe von Rnase Inhibitor bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 DNase-Verdau

Reagenzien/ Protokoll

DNase Verdau

- | | | |
|--|--------|------|
| • 1 µg total RNA | | |
| • 1 µg DNase I (Gibco) | | |
| • 1 µg DNase I 10x Reaction Buffer (Gibco) | | |
| • 10 µg a.d. | 15 min | 25°C |
| • 1 µg EDTA (Gibco), 25 mM, pH 8,0 | 10 min | 65°C |

2.2.4.4 Reverse Transkription

Reagenzien/ Protokoll

- | | | |
|--|--------|--------------|
| • 11 µg DNase Verdau (Pharmacia Biotech, GB) | 10 min | 70°C |
| • 1 µg Oligo dT 500 ug/ul (MWG Biotech, Ebersberg) | 3 min | 4°C |
| • 4 µg 5x First Strand Buffer (Gibco) | 2 min | 42 °C |
| • 1 µg 10 mM dNTPs Mix (Pharmacia Biotech) | | |
| • 2 µg 0,1 M DTT (MWG Biotech) | 50 min | 42 °C |
| • 1 µl M-MLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus-Reverse-Transkriptase, 10 U/ml; Gibco) | 15 min | 70 °C / 4 °C |

Durchführung

Die gewonnene RNA wurde in eine DNA umgeschrieben, indem eine Anlagerung spezifischer Primer mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase vom 3'-Ende einer mRNA eine cDNA synthetisiert (Belyavsky et al. 1989). Als Primer dienten Oligo-dTs, die komplementär zu den Poly-A Enden der RNA waren. Der DNase Verdau und die reverse Transkription wurden in einem Thermocycler (Modell

GeneAmp 2400; Perkin-Elmer, Weiterstadt) nach dem oben aufgeführten Protokoll durchgeführt. Die Reagenzien-Mengenangabe bezieht sich auf einen einfachen Ansatz (20 µl).

2.2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Primer:

HO-2 Primer (MWG Biotech, Ebersberg)

P HO2 rat: Vorwärtsprimer

5'-GCC GGA TCC TCT TCA GAG GTG GAG ACC TCG GAG GGC GTC GAT-3'

M HO2 rat: Rückwärtsprimer

5'-GCC AAG CTT CAT GTA GTA CCA GGC CAA GAG TCC AGC TAC CAA-3'

Reagenzien

- | | |
|--|----------------------|
| • PCR Puffer (5x RT-Puffer; Gibco) | 4 µl |
| • MgCl ₂ -Lösung D (Gibco) | 5 µl |
| • P-/M-Primer (20 pmol) | je 1 µl |
| • dNTPs Mix (10 nmol; Pharmacia Biotech) | 1 µl |
| • cDNA (Gibco) | 1 µl |
| • Taq DNA-Polymerase (MWG Biotech) | 2,5 U
(= 0,4 µl) |

Durchführung

Der PCR-Ansatz durchlief 30 Zyklen in einem Thermocycler (Modell GeneAmp 2400; Perkin-Elmer) mit folgenden Schritten für jeden Zyklus: 1) Denaturierung der DNA bei 94 °C für 45 sec, Anlagerung der Primer (Annealing) bei 78 °C für eine Minute und Amplifikation bzw. Synthese des PCR-Produkts bei 72 °C für eine Minute. Die optimale Annealingtemperatur lag primerspezifisch ca. 10 °C unterhalb seiner Schmelztemperatur. Nach 30 Zyklen wurden die unvollständig transkribierten PCR-Produkte bei einer Temperatur von 78 °C für weitere 5 min zur Komplementierung inkubiert, sowie eine abschließende Elongation bei 72 °C über 7 min durchgeführt. Die Lagerung des PCR-Produkts erfolgte bei 4 °C. Die Kontrolle zur Qualifizierung

und Quantifizierung wurde mittels eines Agarosegels (2 %) in einer Gelelektrophorese überprüft, 1% Ethidiumbromid diente als Indikator.

Die Primer der PCR waren gegen die Basen 4-36 und 945-913 der Hämoxygenase 2 aus Rattenhoden gerichtet. Die errechnete Länge der PCR-Produkte liegt damit bei 941bp.

2.2.4.6 Kontrollen

Als Negativkontrollen dienten a. d. und PCR-Ansatz ohne reverse Transkription.

Als Positivkontrolle wurde RNA aus Rattenhirn eingesetzt, da hier die Hämoxygenase-2 konstitutiv vorhanden ist.

ERGEBNISSE

Die nachfolgend dargestellten Ergebnisse wurden für Ratten- und Meerschweinchengewebe erhoben, für alle Untersuchungen gilt: $n = 5-8$. Es wurden keine Unterschiede hinsichtlich der untersuchten Parameter zwischen den beiden Spezies festgestellt. In den Abbildungen sind jeweils die Ergebnisse für eine der beiden Spezies wiedergegeben.

3.1 Das Modell des N. ischiadicus in Organkultur

Die morphologische Untersuchung der Quetschungsstellen des N. ischiadicus (Meerschweinchen und Ratte jeweils $n = 5$) zeigte in allen Fällen eine Unterbrechung des axonalen Transports und eine Degeneration im Bereich der Quetschungsstelle und distal davon (Abb. 2). Die Unterbrechung des axonalen Transportes nach Quetschung resultierte in der Anreicherung der Immunreaktivität für HO-2 (s. Abb. 2b), für PGP 9.5 und für Substanz P (ohne Abb.). Die ultrastrukturelle Analyse der Quetschungsstelle zeigte eine Degeneration der Schwann-Zellen sowie partiell der Axone (Abb. 2c). Durch die Entnahme verursachte Veränderungen des Nerven im Bereich der Durchtrennungsstellen wurden in diesem Zusammenhang ultrastrukturell nicht näher untersucht. Die Läsionsexperimente des N. ischiadicus wurden ausschliesslich in Organkultur durchgeführt. Eine direkte vergleichende Untersuchung zwischen der Situation der Nervenläsion *in vivo* und den Quetschungen in Organkultur konnte daher nicht durchgeführt werden.

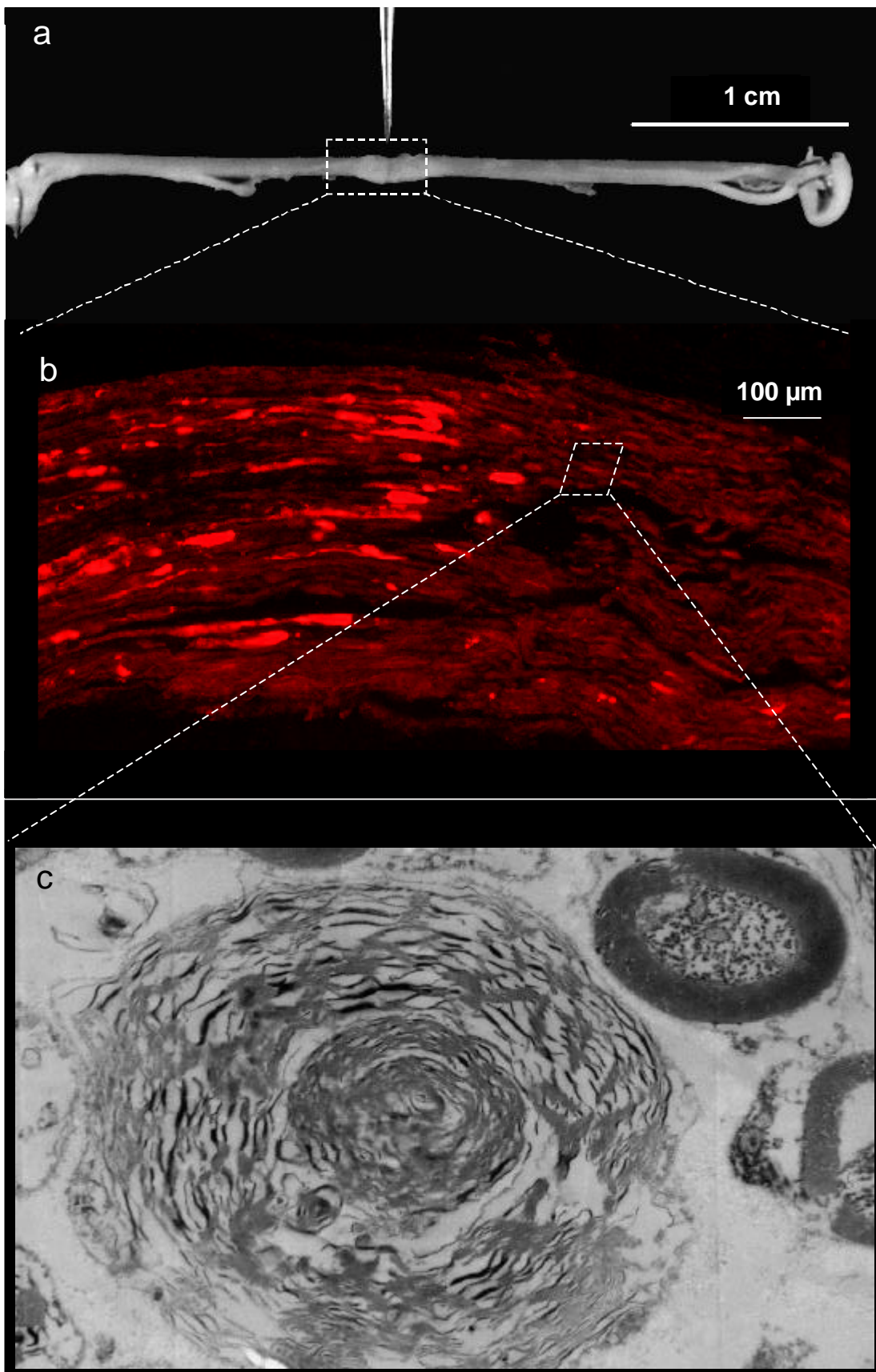


Abb. 2 Organkultur des N. ischiadicus des Meerschweinchens. (a) Aufgespannter Nerv. Pfeil auf der Läsionsstelle. (b) Quetschungsstelle mit Akkumulation der HO-2 Immunreaktivität (c) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch den N. ischiadicus im Bereich der Quetschungsstelle zeigt eine Degeneration der Schwann-Zell-Umhüllung und eine axonale Schädigung (Vergrößerung: 23100x).

3.2 Immunhistochemie: Lokalisation der Hämoxygenasen im ungequetschten Nerven

3.2.1 HO-1

Der Vergleich von frisch entnommenen Nn. ischiadici der Ratte und des Meerschweinchens (jeweils $n = 5$) mit Nn. ischiadici, die für 48 h in Organkultur gehalten wurden (Ratte $n = 4$, Meerschweinchen $n = 6$), zeigte keine Unterschiede hinsichtlich der HO-1-Immunreaktivität (Abb. 3). HO-1-Immunreaktivität wurde sowohl in frisch entnommenen Nn. ischiadici (Abb. 3a) als auch in den für 24 h kultivierten, ungequetschten Nn. ischiadici (Abb. 3b) in einzelnen spindelförmigen, nicht-neuronalen Zellen gesehen. Diese Zellen sind in der Doppelimmunfluoreszenz für das von den Schwann-Zellen exprimierte Intermediärfilament Vimentin nicht Vimentin-immunreaktiv. In den Axonen des N. ischiadicus wurde keine HO-1-Immunreaktivität beobachtet (Abb. 3 a,b). Nach Präabsorption des HO-1 Antiserums durch rekombinantes Protein waren keine immunreaktiven Zellen zu beobachten.

3.2.2 HO-2

Immunreaktivität für HO-2 wurde weder im frisch entnommenen (Abb. 3c) noch im für 24 h kultivierten N. ischiadicus (Abb. 3d) gesehen. In den als Positivkontrolle zur Überprüfung der immunhistochemischen Inkubation mitgeführten Schnitten von Spinalganglien wurde eine starke Immunreaktion in allen Perikaryen nachgewiesen (Abb. 3e).

Nach Vorinkubation des Antiserums mit dem rekombinanten HO-2 Protein wurde in Spinalganglien keine Immunreaktivität beobachtet (Abb. 3f).

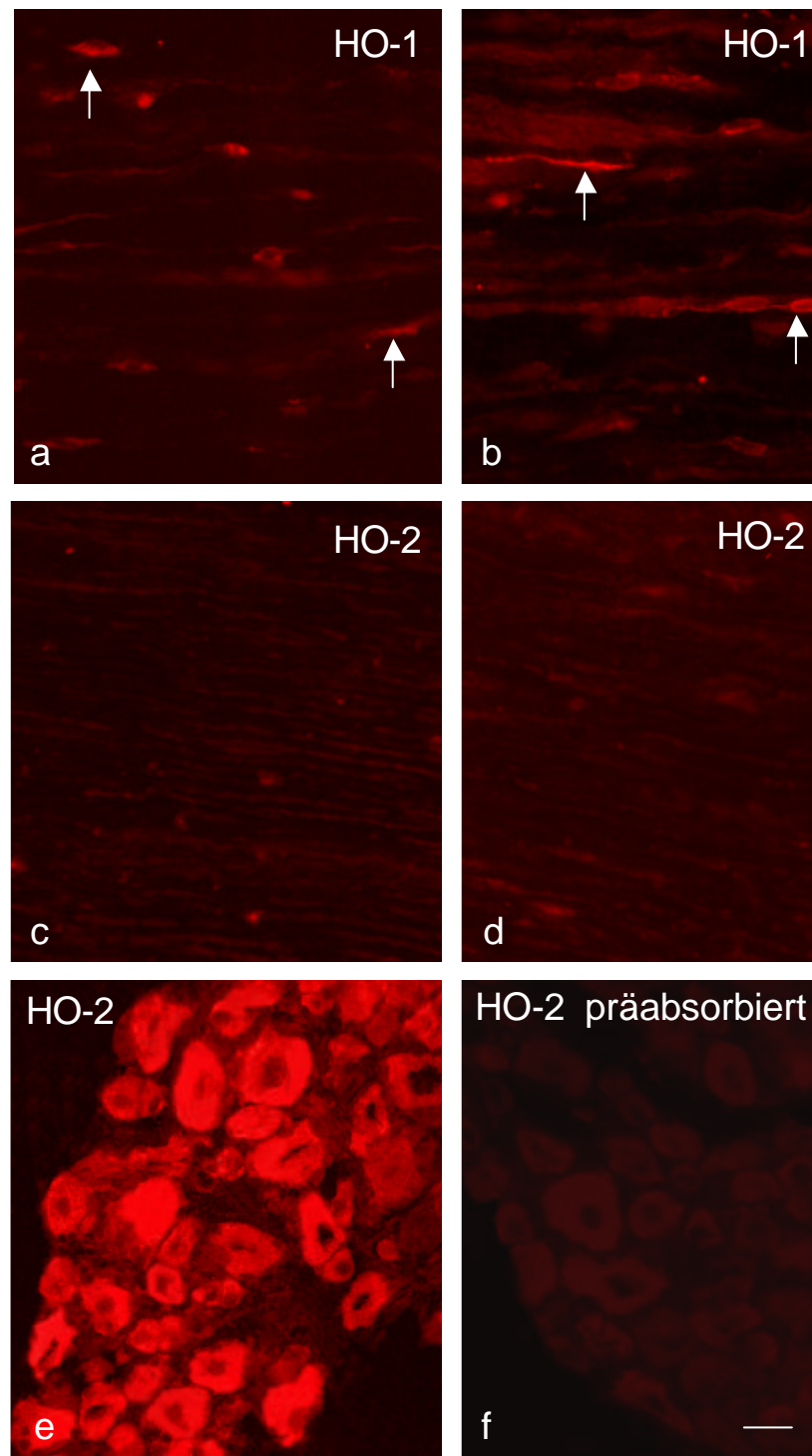


Abb. 3

Vergleich der HO-1- und HO-2-Immunreaktivität im frisch entnommenen und im kultivierten N. ischiadicus des Meerschweinchens.

(a,b) HO-1-Immunreaktivität wurde (a) im frisch entnommenen und (b) im 48 h kultivierten N. ischiadicus in spindelförmigen, nicht-neuronalen Zellen (Pfeile) gesehen.

(c,d) HO-2-Immunreaktivität ist im ungequetschten N. ischiadicus weder (c) direkt nach Entnahme noch (d) nach Organkultur nachweisbar.

(e, f) HO-2-Immunreaktivität im Spinalganglion (L5) des Meerschweinchens. (e) Die Perikaryen der sensiblen Neurone weisen eine starke HO-2-Immunreaktivität auf. (f) Nach Präabsorption mit rekombinanter HO-2 fehlt die Immunreaktivität. Balken entspricht 20 µm.

3.3 Immunhistochemie: Lokalisation der Hämoxygenasen nach Nervenläsion

3.3.1 HO-1

Die Quetschung des N. ischiadicus im Organkulturmodell führte zu keiner Veränderung der Verteilung der HO-1 Immunreaktivität. Sowohl in den ungequetschten Nerven (Abb. 4a) als auch bei Nervenquetschung (Abb. 4b) wurde HO-1-Immunreaktivität in einzelnen spindelförmigen Zellen gesehen, die keine gleichzeitige Vimentin-Immunreaktivität aufwiesen.

Die Zahl dieser Zellen erschien nach Quetschung gegenüber den ungequetschten Kontrollen erhöht zu sein. Eine Quantifizierung dieser Zellen wurde nicht durchgeführt.

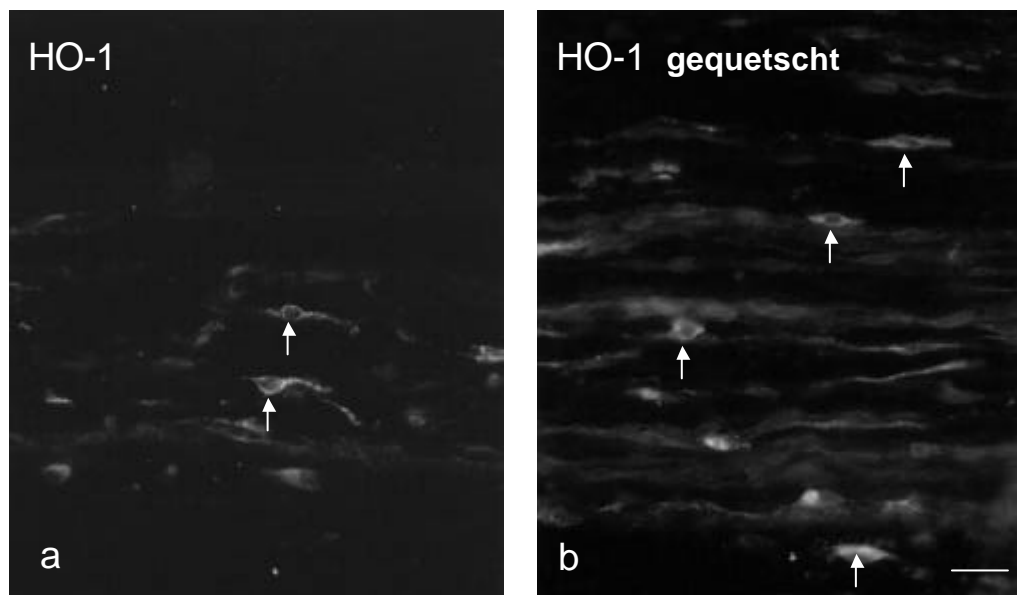


Abb. 4

HO-1 Immunreaktivität im kultivierten N. ischiadicus der Ratte.

Die HO-1-Immunreaktivität ist in spindelförmigen Zellen (Pfeile) lokalisiert, die am ehesten Fibroblasten oder Makrophagen entsprechen.

Im Vergleich zur Situation ohne Nervenquetschung (a) erscheint die Zahl der HO-1-immunreaktiven Zellen nach Nervenquetschung (b) leicht erhöht.

Balken entspricht 20 µm.

3.3.2 HO-2

Nach Quetschung des N. ischiadicus im Organkulturmodell wurde im Gegensatz zu den ungequetschten Kontrollen HO-2-Immunreaktivität beobachtet (Abb. 5). Im Querschnitt durch den Bereich unmittelbar vor der Läsionsstelle ist diese Immunreaktivität in ring- oder kommaförmigen Zellen lokalisiert, die nach ihrer Morphologie am ehesten Schwann Zellen entsprechen (Abb. 5b).

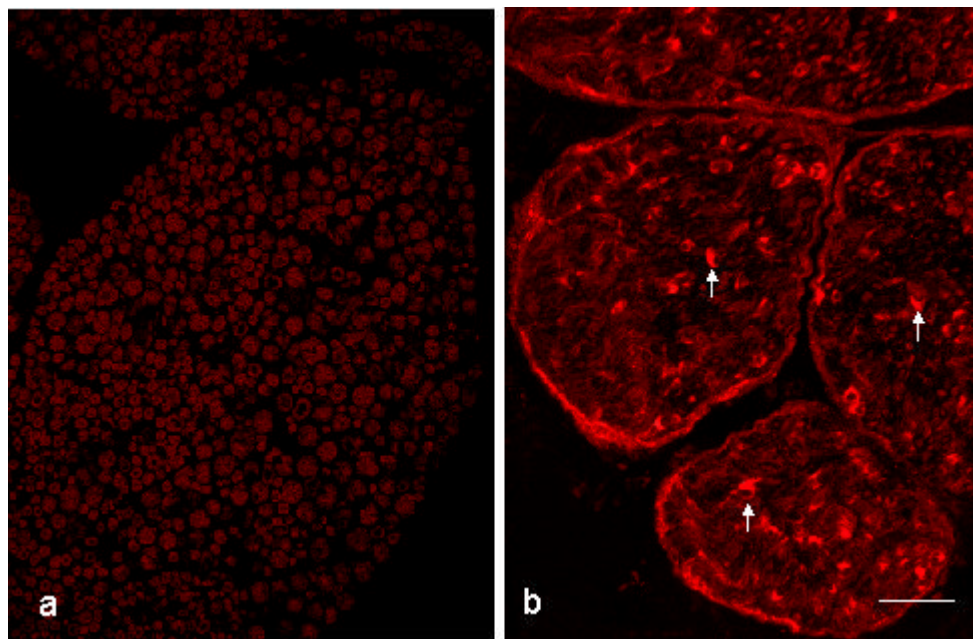


Abb. 5

Querschnitt durch den N. ischiadicus des Meerschweinchens im Bereich unmittelbar vor der Quetschungsstelle nach Organkultur.

Im ungequetschten Nerven (a) ist keine HO-2-Immunreaktivität nachweisbar.

(b) Nach Nervenquetschung treten HO-2-immunreaktive Zellen auf deren typische halbmondförmige Morphologie Schwann-Zellen entspricht (Pfeile).

Balken = 80 μ m.

Im Längsschnitt ist die HO-2-Immunreaktivität vor allem im Bereich unmittelbar vor und nach der Quetschungsstelle anzutreffen (Abb. 6 a,b; 7). Die HO-2-Immunreaktivität zeigt sich als Akkumulation in Axonen und in Zellkörpern nicht-neuronaler Zellen (Abb. 6 a,b).

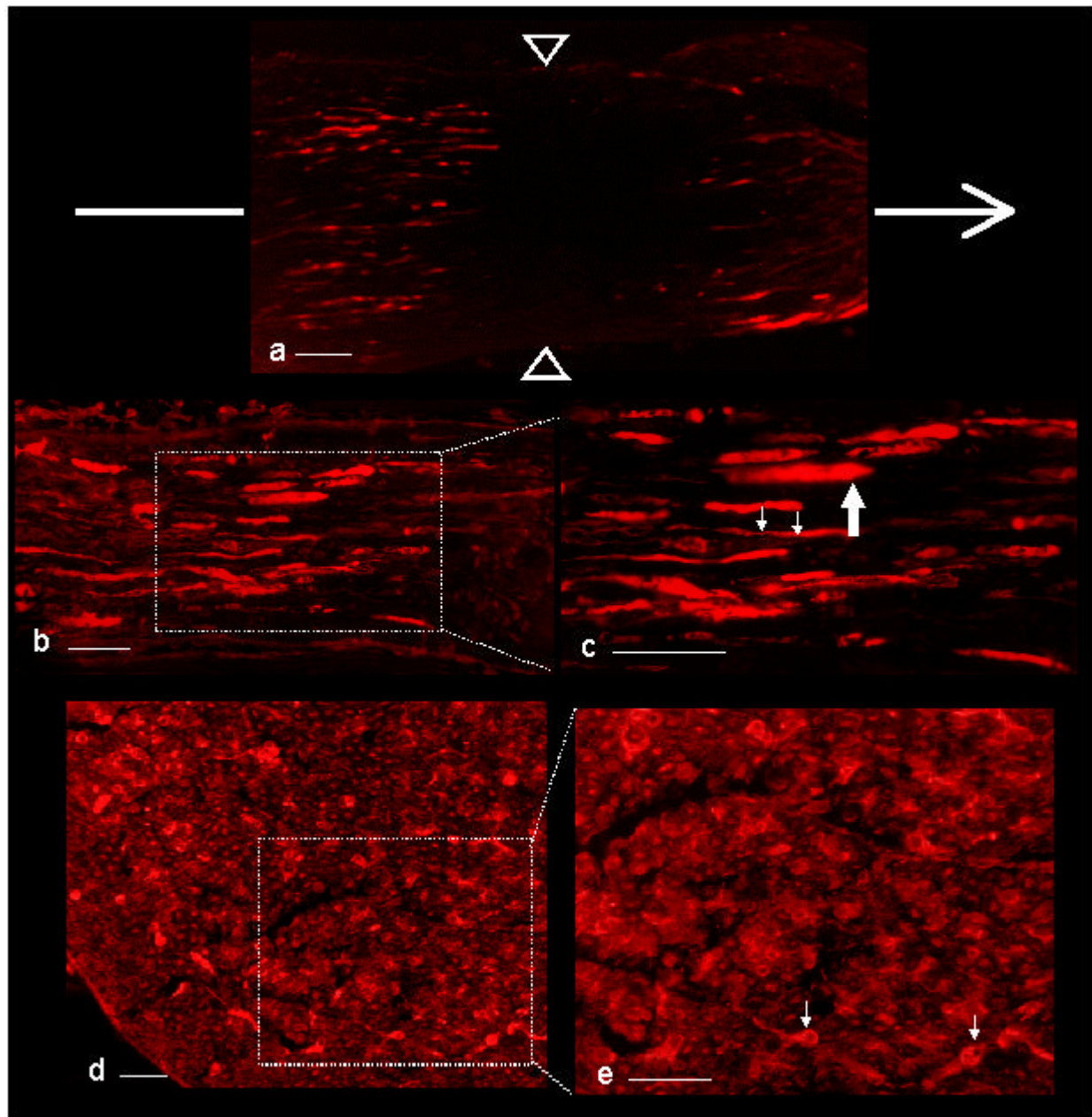
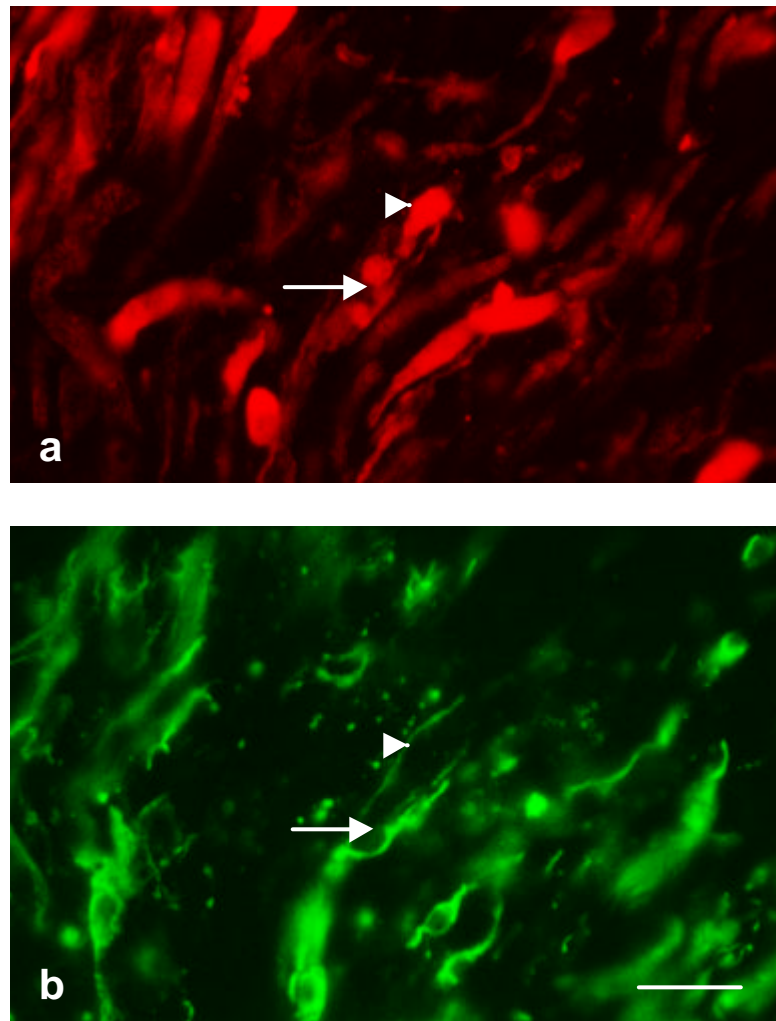


Abb. 6

HO-2 Immunreaktivität im kultivierten N. ischiadicus des Meerschweinchens nach Nervenquetschung.

(a) Die HO-2-Immunreaktivität fehlt im unmittelbaren Bereich der Quetschungsstelle (Pfeilköpfe), akkumuliert aber vor allem im Bereich vor der Quetschungsstelle (links) und in geringerem Ausmass auch dahinter (rechts), Pfeil weist nach peripher.

(b,c) Im Längsschnitt findet sich die HO-2-Immunreaktivität vor allem im Bereich vor der Quetschungsstelle. (c) Im höher vergrösserten Ausschnitt aus (b) zeigt sich eine Akkumulation der HO-2-Immunreaktivität in Axonen (großer Pfeil) und HO-2-immunreaktive Zellkörpern (kleine Pfeile). (d,e) Querschnitt im Bereich vor der Läsionsstelle. In der Übersicht (d) und im höher vergrösserten Ausschnitt (e) zeigen die HO-2-immunreaktiven Zellen ein ring- oder halbmondförmiges Aussehen. Balken entspricht 100 μm in (a), 30 μm in (b,d) und 20 μm in (c,e).

**Abb. 7**

Immunreaktivität für HO-2 (a) und für Vimentin (b) im kultivierten N. ischiadicus des Meerschweinchens nach Nervenquetschung im Längsschnitt.

(a,b) Die gleichzeitige Inkubation mit einem Antikörper gegen Vimentin zeigt, dass es sich bei den HO-2-immunreaktiven Zellen um Vimentin-immunreaktive Zellen (Schwann-Zellen) handelt (Pfeile). Daneben findet sich HO-2-Immunreaktivität ohne gleichzeitige Vimentin-Immunreaktivität (Pfeilspitzen).

Balken entspricht 20 µm.

Im unmittelbaren Bereich der Quetschungsstelle ist keine HO-2-Immunreaktivität zu beobachten. Die stärkste HO-2-Immunreaktivität ist im Bereich vor der Quetschungsstelle zu sehen, es finden sich aber auch HO-2-immunreaktive Schwann Zellen und Axone hinter der Läsionsstelle. Die immunhistochemische Doppelmarkierung von HO-2 und Vimentin bestätigt, dass es sich bei den HO-2-immunreaktive Zellkörpern um Schwann Zellen handelt (Abb. 7).

3.3.3 Kontrollen

Das Ersetzen der primären Antiseren gegen HO-1 und HO-2 durch Phosphatpuffer und die Präabsorption mit dem korrespondierenden Antigen führte zum Ausbleiben der Immunreaktion (Abb. 8). Die Immunreaktionen wurden daher als spezifisch angesehen.

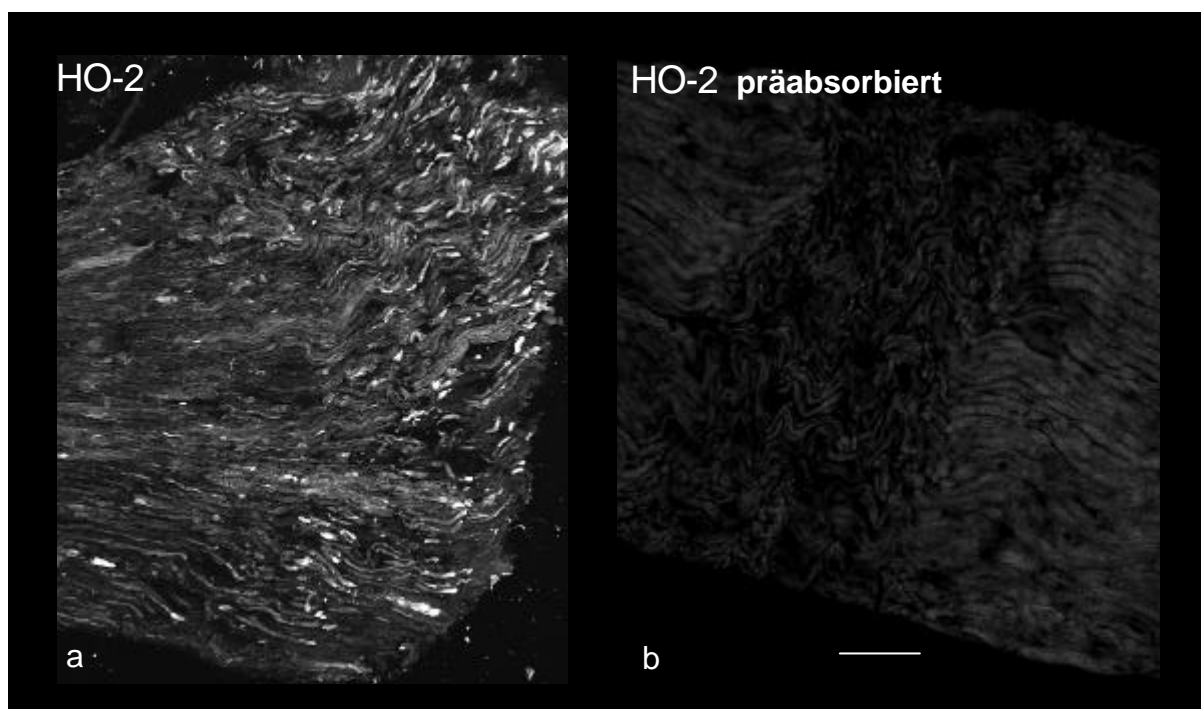


Abb. 8

Kontrolle der Spezifität der Immunreaktion:

- (a) zeigt eine HO-2-Immunreaktivität in Schwann-Zellen und eine Akkumulation der HO-2-Immunreaktion in Axonen vor der Läsionsstelle.
- (b) Nach Präabsorption des Antiserums mit rekombinantem Protein fehlt die Immunreaktion.

Balken entspricht 50 μm .

3. 4 Western-Blot-Analyse

Wie auch bei den Ergebnissen anderer Techniken angegeben, ergaben auch die Western-Blot-Analysen für Nerven der Ratte und des Meerschweinchens gleiche Ergebnisse.

3.4.1 HO-1

Nach Organkultur des N. ischiadicus und Proteinextraktion findet sich eine immunreaktive Bande im Bereich von 32 kD (Abb. 9). Dies entspricht dem Molekulargewicht der HO-1 (HSP-32). In parallel verlaufenden Spuren der selben Blots zeigt sich bei einer gleichen Menge aufgetragenen Extrakts des N. ischiadicus nach Quetschung eine etwas stärker ausgeprägte Bande bei 32 kD.

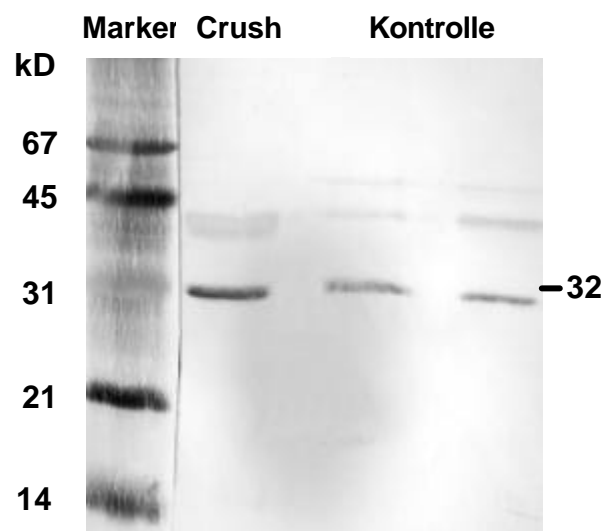


Abb. 9

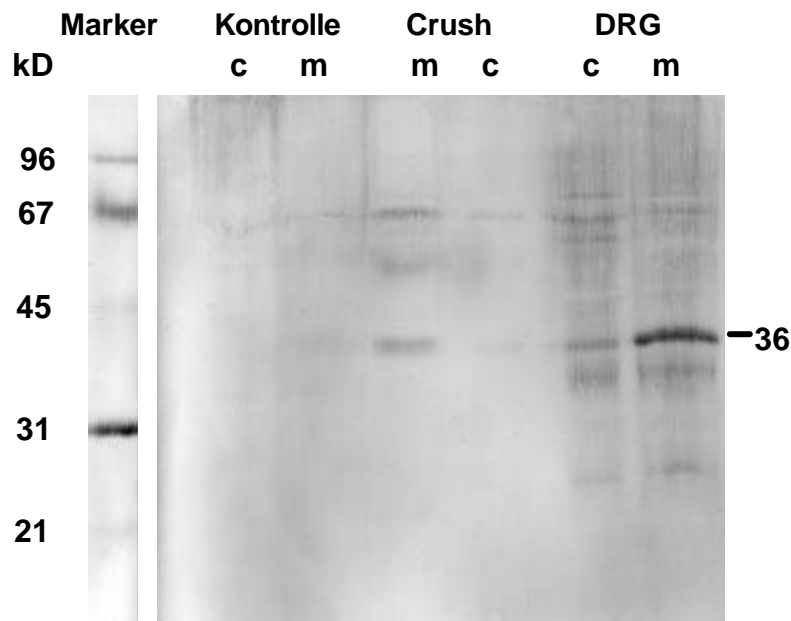
Western-Blot-Analyse der HO-1-Immunreaktivität in Protein-Gesamtextrakten des N. ischiadicus des Meerschweinchens.

In den beiden Spuren mit Extrakten des N. ischiadicus nach Organkultur (Kontrolle) finden sich jeweils immunreaktive Banden im Bereich von 32 kD. Nach Quetschung des N. ischiadicus (Crush) ist eine etwas stärker ausgeprägte Bande bei 32 kD nachzuweisen. Alle Nerven wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und in allen Spuren wurde die gleiche Menge Proteinextrakt aufgetragen.

3.4.2 HO-2

Die Western-Blot-Analyse der HO-2-Immunreaktivität in Protein-Gesamtexttrakten von Spinalganglien des Meerschweinchens zeigt eine immunreaktive Bande bei 36 kD. Die Bande ist in der Membran-Fraktion sehr stark ausgeprägt, in der Cytosolfraktion dagegen ist nur eine schwache Bande nachweisbar (s. Abb 10).

In der Cytosol (c)- und in der Membran (m)-Fraktion von Proteinextrakten des N. ischiadicus nach Organkultur (Kontrolle) sind keine immunreaktiven Banden nachweisbar. Nach Quetschung des N. ischiadicus (Crush) findet sich eine Bande bei 36 kD in der Membranfraktion (m), nicht aber in der Cytosolfraktion (c). Eine bei gleicher aufgetragener Proteinmenge stärkere immunreaktive Bande ist für die Spinalganglien (dorsal root ganglia = DRG) nachzuweisen. Alle Nerven wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und in allen Spuren wurde die gleiche Menge Proteinextrakt aufgetragen.

**Abb. 10**

Western-Blot-Analyse der HO-2-Immunreaktivität in Protein-Gesamtextrakten des N. ischiadicus und Spinalganglion des Meerschweinchens.

In Cytosol (c)- und in der Membran (m)-Fraktion von Proteinextrakten des N. ischiadicus nach Organkultur (Kontrolle) sind keine immunreaktiven Banden nachweisbar. Nach Quetschung des N. ischiadicus (Crush) findet sich eine Bande bei 36 kD in der Membranfraktion (m), nicht aber in der Cytosolfraction (c). Eine bei gleicher aufgetragener Proteinmenge stärkere immunreaktive Bande ist für die Spinalganglien (dorsal root ganglia = DRG) nachzuweisen. Alle Nerven wurden unter gleichen Bedingungen kultiviert und in allen Spuren wurde die gleiche Menge Proteinextrakt aufgetragen.

3.4.3 Spezifitäts-Kontrollen

Die Überprüfung der Spezifität der HO-2-immunreaktiven Bande bei 36 kD in der Western-Blot-Analyse durch Präabsorption ergab, dass weder in der Cytosol- noch in der Membranfraktion der Proteinextrakte aus Spinalganglien (DRG) des Meerschweinchens immunreaktive Banden im Bereich von 36 kD nachweisbar waren. Die immunreaktive Bande bei 36 kD wurde daher als spezifisch angesehen.

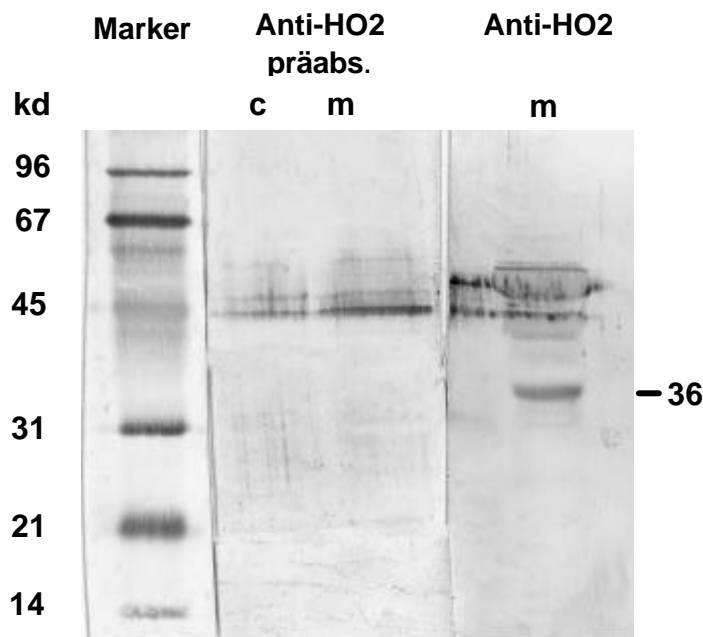


Abb. 11

Spezifitätskontrolle der HO-2-Immunreaktivität in der Western-Blot-Analyse durch Präabsorption.

Weder in der Cytosol (c)- noch in der Membran (m)-Fraktion von Proteinextrakten aus Spinalganglien (DRG) des Meerschweinchens nach Organkultur (Kontrolle) sind nach der Präabsorption des HO-2 III-Antiserums immunreaktive Banden im Bereich von 36 kD nachweisbar. In der nicht-präabsorbierten Positiv-Kontrolle (Membranfraktion) findet sich die HO-2 entsprechende Bande 36 kD. Die Banden im Bereich von 45-60 kD sind nicht spezifisch für HO-2.

3.5 RT-PCR

In der Untersuchung der HO-2-mRNA-Expression im N. ischiadicus des Meerschweinchens mittels RT-PCR wurden Amplifikate mit der errechneten Länge von 941 Basenpaaren nur nach Nervenläsion nachgewiesen (Abb. 12). Als Positivkontrolle wurde HO-2-mRNA auch im Gehirn gefunden, wo eine konstitutive Expression unter normalen Bedingungen bekannt ist. In ungequetschten Nn. ischiadici wurde unter den selben RT-PCR Bedingungen keine HO-2-mRNA nachgewiesen. Bei Einsatz einer mRNA ohne vorherige reverse Transkription für die PCR-Reaktion und bei Verwendung von Wasser kam es zu keinem Amplifikat (Abb. 12).

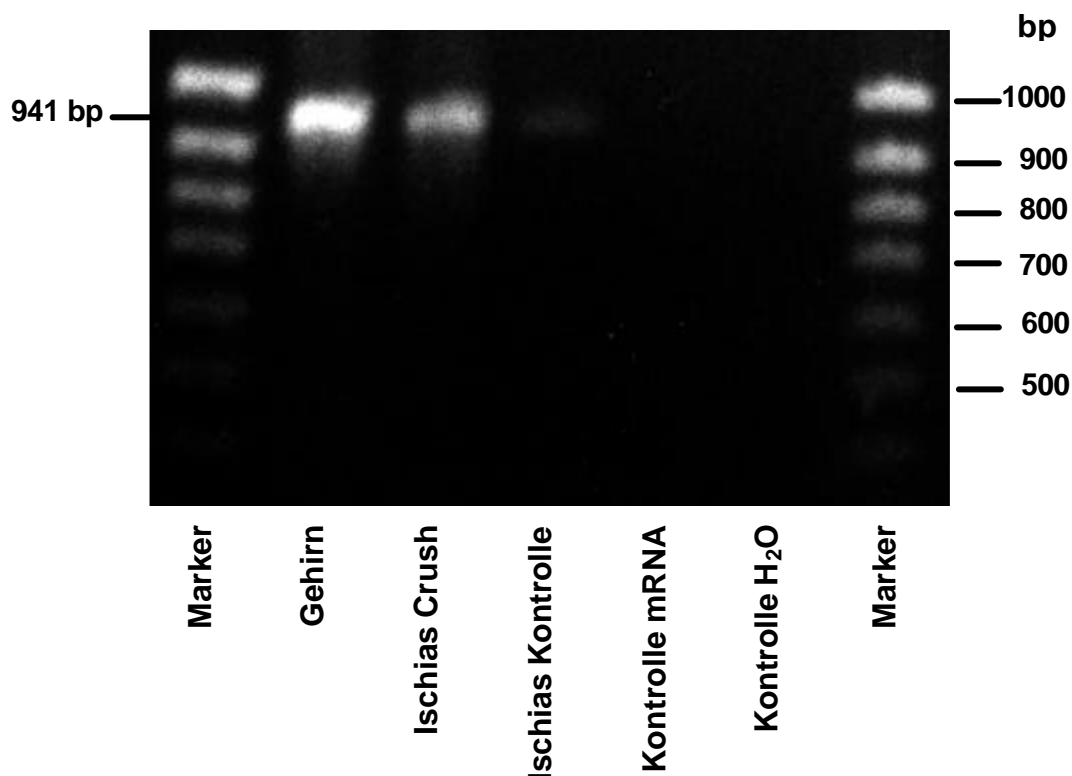


Abb. 12

Nachweis der HO-2-mRNA mittels RT-PCR.

Im N. ischiadicus des Meerschweinchens nach Nervenläsion (Ischias Crush) und in Extrakten aus dem Gehirn ist HO-2-mRNA nachweisbar. Im ungequetschten N. ischiadicus (Ischias Kontrolle) wurde HO-2-mRNA allenfalls minimal gefunden. Kontrollen: mRNA ohne reverse Transkription, H₂O statt mRNA.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell des Nervus ischiadicus die Expression und Verteilung der Hämoxygenase-Isoenzyme im peripheren Nerven untersucht. Anlass für diese Untersuchungen war die erst seit wenigen Jahren bekannte neue Bedeutung der Hämoxygenasen. So wird der enzymatische Abbau von Häm durch die Hämoxygenasen inzwischen nicht mehr als eine reine Abbaureaktion angesehen, sondern den entstehenden Produkten Kohlenmonoxid als Mediator und Bilirubin als Antioxidans wesentliche physiologische Bedeutung beigemessen (Übersicht bei Marilena 1997). Um die grundlegenden Fragen der Expression von Hämoxygenasen im peripheren Nervensystem und Veränderungen nach einer durch Quetschung verursachten Nervenläsion zu untersuchen, erwies sich der Nervus ischiadicus als gut geeignetes Modell.

4.1 Die Organkultur des Nervus ischiadicus als Modell

Der Nervus ischiadicus weist eine Reihe von Vorteilen auf, die ihn zu einem häufig verwendeten Objekt zur Untersuchung peripherer Nerven machen (Liuzzi & Tedeschi 1991). Zu diesen Vorteilen zählt, dass er der größte periphere Nerv der Wirbeltiere ist und somit eine ausreichende Menge an Untersuchungsmaterial bietet. Der aus einem einzelnen N. ischiadicus gewonnene Proteinextrakt reicht für eine Western-Blot-Analyse aus, während bei anderen peripheren Nerven die Verwendung von Nerven mehrerer Tiere nötig gewesen wäre.

Hinsichtlich der Zusammensetzung seiner Nervenfaserqualitäten ist er repräsentativ für die meisten peripheren Nerven, da er alle wesentlichen Faserqualitäten führt: somatisch (afferent und efferent) sowie viszeral (afferent und efferent). Die Perikaryen aller dieser Nervenfasern liegen im Rückenmark oder in

rückenmarksnahen Ganglien. Die entnommenen Nervenstücke enthalten dagegen nur die Axone der Nervenzellen. Aufgrund dieser räumlichen Trennung kann die mRNA-Expression in den kultivierten Nervenstücken daher den nicht-neuronalen Zellen des Nerven zugeordnet werden.

Das Überleben und die Homöostase der Nervenzellen wird wesentlich durch trophische Faktoren (insbesondere neurotrophe Faktoren) bestimmt, die vom innervierten Zielgebiet und von der Umgebung freigesetzt werden (Fernandez et al. 1990). Daher könnte die Entnahme des Nerven aus dem Organismus und die kurzzeitige Kultur *in-vitro* zu Veränderungen hinsichtlich der untersuchten Parameter führen.

Unter den hier gewählten serumfreien Kulturbedingungen wurden auf mRNA- und Proteinebene für die Hämoxygenasen jedoch keine Unterschiede zwischen den frisch entnommenen und den bis zu 72 Stunden in begastem Medium kultivierten N. ischiadici gefunden. Für die hier getroffenen Aussagen zur Lokalisation und Regulation der Hämoxygenasen ist ausserdem der Erhalt wichtiger physiologischer Eigenschaften wie beispielsweise der axonalen Transportaktivität im Nerven *in vitro* auch nach der Entnahme aus dem Organismus von Bedeutung. Nach Ligatur oder Quetschung des Axons führt die anterograde axonale Transportaktivität zu einer Akkumulation von Proteinen vor der Läsionsstelle. Durch den retrograden Transport kommt es auch zu einem geringen Aufstau distal der Quetschungsstelle. Proteine, die aufgrund ihrer geringen lokalen Konzentration immunhistochemisch nicht nachweisbar sind, stauen sich durch die Quetschung auf. Die erhöhte lokale Konzentration der axonal transportierten Proteine lässt sich dann mittels Immunhistochemie darstellen (s. Abb 13).

Insgesamt machen die genannten Übereinstimmungen zwischen frisch entnommenem und kultivierten Nn. ischiadici hinsichtlich der Hämoxygenase-

Expression und des Erhaltes der axonalen Transportmechanismen das verwendete Organkultursystem zu einem sehr gut geeigneten Modell für die hier bearbeitete Fragestellung der Lokalisation und der Regulation von Hämoxygenasen.

4.2 Hämoxygenase-1 (HO-1)

Ursprünglich wurde HO-1 als ein Enzym beschrieben, das nur in Leber und Milz konstitutiv exprimiert wird (Yoshida & Kikuchi 1974, Shibahara et al. 1989), (Ewing et al. 1992). Aufgrund der Vielzahl von beschriebenen Faktoren, die zu einer Induktion von HO-1 in nahezu allen Geweben führen können (Ewing et al. 1992, Immenschuh et al. 1998a, Immenschuh et al. 1998b), wird HO-1 als die induzierbare Isoform des Enzyms bezeichnet. In der Promotorregion des HO-1-Gens wurden zahlreiche regulatorische Elemente gefunden, die für diese Induzierbarkeit verantwortlich sind (siehe Tab. 1).

4.2.1 HO-1 im ungequetschten Nervus ischiadicus

Die in der Western-Blot-Analyse von Proteingestamtexttrakten des ungequetschten N. ischiadicus gefundene HO-1-immunreaktive Bande spricht für eine konstitutive Expression dieser Isoform im N. ischiadicus. Im Gegensatz zu den Angaben von Iselin und Mitarbeitern, die beim Schwein ein konstitutives Vorkommen von HO-1 in grossen Nervenfaserbündeln in der äusseren Organwand des Ureters beobachtet haben (Iselin et al. 1997) konnte die HO-1 im N. ischiadicus des Meerschweinchens und der Ratte mittels Immunhistochemie in Axonen nicht lokalisiert werden. Das von (Magnusson et al. 2000) beschriebene Vorkommen in gangliennahen Axonen und die Vermehrung nach Organkultur für 24h wurde in dieser Untersuchung nicht bestätigt. Das von (Magnusson & Kanje 1998) beschriebene Vorkommen von HO-1 in Makrophagen in sympathischen und sensiblen Ganglien und gangliennahen

Nerven der Ratte stimmt mit den in dieser Untersuchung erhobenen Befunden für den N. ischiadicus der Ratte und des Meerschweinchens überein.

4.2.2 HO-1 im gequetschten Nervus ischiadicus

Der Vergleich der immunreaktiven Banden in der Western-Blot-Analyse liefert keine exakten Angaben über mengenmäßige Veränderungen von HO-1 im gequetschten N. ischiadicus im Vergleich zur ungequetschten kultivierten Kontrolle und zu frisch entnommenen Nerven. Innerhalb eines Gels herrschen gleiche Versuchsbedingungen und in den Taschen des SDS-PAGE wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen. Daher gibt die Stärke der immunreaktiven Bande einen Anhalt für deutliche Änderungen der relativen Proteinmenge. Der Vergleich der Intensität der Banden zwischen Extrakten frisch entnommener und ungequetscht oder nach Quetschung kultivierter Nerven spricht für eine leichte HO-1-Erhöhung, die auf die vermehrte Zahl HO-1 immunreaktiver Zellen zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu HO-2 wurde für HO-1 auch nach Quetschung die immunreaktiven Zellen nicht näher charakterisiert. Wenn HO-1, wie von Iselin und Mitarbeitern (1997), beschrieben in Nervenfasern vorkommt und auch axonal transportiert wird, wäre eine Akkumulation an den Quetschungsstellen zu erwarten. Eine solche Akkumulation war jedoch nicht nachweisbar, weshalb ein axonaler Transport von HO-1 im N. ischiadicus nicht wahrscheinlich ist.

Im Zentralnervensystem wurde unter verschiedenen pathologischen Bedingungen eine HO-1-, nicht aber eine HO-2 Induktion beschrieben. Zu diesen Bedingungen zählen traumatische Schäden (Fukuda et al. 1995), eine dauerhaft fokale (Geddes et al. 1996) oder vorübergehend globale (Takeda et al. 1994) Ischämien und die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (Matsuoka et al. 1999). Die Induktion der HO-1 wurde dabei auf mRNA und Proteinebene beschrieben und war sowohl in

Neuronen wie auch in Gliazellen nachweisbar (Geddes et al. 1996). Im hier untersuchten peripheren Nerven ist nur eine Vermehrung von HO-1 in den nicht-neuronalen Zellen nachweisbar.

4.3 Hämoxygenase-2 (HO-2)

In der ersten Beschreibung der HO-2 als neue Isoform der Hämoxygenase wurden Gehirn und Hoden als die wesentlichen Organe der konstitutiven HO-2 Expression beschrieben (Maines et al. 1986). Die zelluläre Expression der HO-2 im Rattenhirn wurde immunhistochemisch ausschliesslich Neuronen zugeordnet (Ewing & Maines 1997, Raju et al. 1997), während andere Zelltypen im Gehirn, wie z.B. Gliazellen, Endothelien oder Plexusepithelien keine konstitutive HO-2-Immunreaktivität aufwiesen (Ewing & Maines 1997).

4.3.1 HO-2 in ungequetschten peripheren Nerven

Eine konstitutiv auftretende HO-2-Immunreaktivität in Axonen des peripheren Nervensystems wurde bislang nur für die Innervation einzelner peripherer Organe untersucht. Übereinstimmend wird dabei in den Nervenzellkörpern der lokalen parasympathischen Ganglien HO-2-Immunreaktivität beschrieben (Canning & Fischer 1998, Grozdanovic & Gossrau 1996). Neben der neuronalen Lokalisation wurde HO-2-Immunreaktivität auch in Strukturen der Gefässwand (Endothelzellen, Muskelzellen) sowie in der glatten Muskulatur verschiedener Organe (Atemwege, Dünndarm, Myometrium) bei der Ratte (Grozdanovic & Gossrau 1996) sowie für die Atemwegsmuskulatur auch beim Meerschweinchen (Undem et al. 1996) gezeigt. Im Gegensatz zur Lokalisation in den Zellkörpern sind die Angaben über das axonale Vorkommen der HO-2 uneinheitlich. In den meisten Untersuchungen wurde keine Hämoxygenase-Immunreaktivität in den Nervenfasern der Organwand (Vollerthun et

al. 1995, Grozdanovic & Gossrau 1996, Canning & Fischer 1998) nachgewiesen. Von einigen Autoren dagegen wurde HO-2-Immunreaktivität in Nervenfasern an Gefässen (Zakhary et al. 1996) und in der Magenwand (Porcher et al. 1999) beschrieben. Im somatischen Nervensystem wurde HO-2 an motorischen Endplatten aufgrund von Denervationsstudien überwiegend der postsynaptischen Membran zugeordnet (Kusner et al. 1999).

Die Diskrepanz des Nachweises von HO-2-Immunreaktivität zwischen Zellkörper und Axon liegt möglicherweise an den unterschiedlichen Proteinmengen, die an beiden Lokalisationen vorhanden sind. So liegen im Axon möglicherweise nur geringe Proteinmengen vor, die unterhalb des immunhistochemisch nachweisbaren Detektionslimits liegen, während im Soma die Menge so gross ist, dass der immunhistochemische Nachweis möglich ist. Eine ähnliche Situation wurde für die neuronale Isoform der NO-Synthase (nNOS = NOS I) beschrieben. Bei immunhistochemischen Untersuchungen peripherer Organe, zum Beispiel den Atemwegen des Menschen, fiel im Verhältnis zu den zahlreichen und stark nNOS-immunreaktiven Zellkörpern ein relativ spärliches Vorkommen nNOS-immunreaktiver Nervenfasern auf (Fischer & Hoffmann 1996). Von nNOS wurden zwei alternative mRNA-Splicing-Varianten beschrieben (Oberbaumer et al. 1998). Eine Isoform, die alle Exons enthält, und eine weitere, bei der Exon 2 fehlt. Die vom Exon 2 kodierte Sequenz soll für die Membrananheftung von nNOS verantwortlich sein, die beim axonalen Transport bedeutsam ist. Für HO-2 wurden drei mRNA-Splicing-Varianten beschrieben: rHO-2, rHO-2-1, rHO-2-2 (McCoubrey et al. 1995). Diese weisen jedoch nur Unterschiede im Bereich des nicht-translatierten Exon-1 auf. Unterschiedliche HO-2 Proteinvarianten, die für die somal-axonalen Differenzen verantwortlich sein könnten, wurden bislang nicht beschrieben.

4.3.2 HO-2 in gequetschten peripheren Nerven

Die hier beschriebene Induktion der HO-2-Expression nach peripherer Nervenläsion steht im Gegensatz zu den Angaben für das zentrale Nervensystem.

Nach traumatischer oder ischämischer ZNS-Schädigung wurde eine Induktion von HO-1 bei unveränderter Expression von HO-2 beschrieben (Geddes et al. 1996). Für Retinazellen wurde der Quotient der induzierbaren HO-1 zur konstant exprimierten HO-2 als sensible Methode zur Abschätzung des oxidativen Schadens auf zellulärer Ebene vorgeschlagen (Kutty et al. 1994). Aufgrund dieser Befunde wird HO-2 von einigen Autoren sogar als nicht-induzierbar bezeichnet (Elbirt & Bonkovsky 1999).

Zumindest während der Entwicklung lässt sich jedoch eine gewebespezifische Regulation der HO-2 auf transkriptioneller Ebene nachweisen. Die Regulation erfolgt dabei über Cortison und ein entsprechendes glucocorticoid response element (GRE) in der Promotorregion (Liu et al. 2000). Die Ergebnisse zur mRNA-Expression im N. ischiadicus nach Quetschung in Kultur zeigen erstmals, dass die HO-2 Transkription nicht nur während der Entwicklung, sondern auch nach Läsion im adulten Nerven induziert werden kann. Diese Induktion kann eindeutig den nicht-neuronalen Zellen des Nerven zugeordnet werden, da sich die Perikaryen der Neurone nicht im Verlauf des peripheren Nerven, sondern im Rückenmark und den rückenmarksnahen Ganglien befinden. Die in den Perikaryen der Neurone peripherer Ganglien festgestellte konstitutive Expression von HO-2 (Vollerthun et al. 1995) scheint durch Nervenläsion nicht oder wenig beeinflusst (Magnusson et al. 2000).

Die Induktion der HO-2-mRNA führt auch zu einer vermehrten Expression auf Proteinebene. Auf Proteinebene ist HO-2 im Gegensatz zur mRNA-Ebene im N. Ischiadicus konstitutiv nachweisbar. Damit kann die basale konstitutive HO-2 in Übereinstimmung mit der Literatur den Nervenzellen zugeordnet werden. Diese

konstitutive Expression lässt sich am ungequetschten Nerven wie hier vorgestellt und an den peripheren Endigungen in den innervierten Muskeln (Kusner et al. 1999) immunhistochemisch nicht zeigen. Nach Quetschung akkumuliert jedoch durch anterograden Transport bis zur Läsionsstelle so viel HO-2, dass ein immunhistochemischer Nachweis möglich ist. Eine geringe, immunhistochemisch nicht nachweisbare konstitutive Expression von HO-2 in Gliazellen scheint aufgrund der fehlenden mRNA unwahrscheinlich.

Der deutliche Anstieg der HO-2-Immunreaktivität in den Proteinextrakten nach Läsion ist demnach auf eine *de-novo*-Synthese von HO-2 in nicht-neuronalen Zellen des N. ischiadicus zurückzuführen. Dieser geht eine Induktion der HO-2 Transkription voraus. Diese Neusynthese lässt sich aufgrund der typischen Morphologie und der Vimentin-Immunreaktivität (Marquez et al. 1997) hauptsächlich den Schwann-Zellen zuordnen, auch wenn eine Synthese unterhalb der immunhistochemischen Nachweisgrenze in anderen nicht-neuronalen Zellen des N. ischiadicus (Endothelzellen, Fibroblasten) nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Induktion von Hämoxxygenase nach einer Nervenschädigung wurde bisher nur für HO-1 z.B. durch Ischämie, Trauma oder durch Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren beschrieben. Nach Nervenläsion kommt es typischerweise zu einer starken Vermehrung der Schwann-Zellen durch mitotische Teilung. Diese Vermehrung tritt typischerweise aber erst nach 3 bis 4 Tagen auf (Sofroniew et al. 1999), so daß die hier nachgewiesene Induktion der HO-2 Genexpression in den der Läsionsstelle benachbarten Schwann-Zellen vor deren Proliferation stattfindet.

4.4 Funktionelle Bedeutung der Hämoxxygenasen bei peripherer Nervenquetschung

Für das periphere Nervensystem und den N. ischiadicus als Modell liegen im Vergleich zum zentralen Nervensystem nur wenige Angaben über die funktionelle Bedeutung der Hämoxxygenasen vor. Sie wird dabei zumeist aus den Funktionsstörungen abgeleitet, die bei einer pharmakologischen Blockade oder der genetischen Ausschaltung des HO-1- oder HO-2-Gens entstehen. Beide methodischen Ansätze liefern Hinweise auf die mögliche physiologische oder pathophysiologische Bedeutung der Hämoxxygenasen. Für die pharmakologische Blockade der Hämoxxygenasen werden Protoporphyrin-Abkömmlinge wie Zink-Protoporphyrin IX (ZnPP IX) verwendet, das in Spuren auch während der normalen Hämsynthese gebildet wird (Labbe et al. 1999). Die Verwendung höherer Konzentrationen von ZnPP IX führt zu einer Hemmung des Enzyms, ohne dabei spezifisch für eine der drei Isoformen zu sein. Darüber hinaus wurden auch inhibitorische Effekte von ZnPP IX auf Guanylatzyklase und NO-Synthasen beschrieben (Serfass & Burstyn 1998), die unabhängig von Hämoxxygenasen auftreten. Die genetische Ausschaltung des HO-1- oder HO-2-Gens durch homologe Rekombination („Knockout“-Modelle) kann wertvolle Hinweise auf die physiologische Funktion liefern. Wie bei allen Knockout-Modellen wird die tatsächliche physiologische oder pathophysiologische Relevanz eines Gens jedoch möglicherweise durch entwicklungsabhängige Kompensationsmechanismen verschleiert.

Die in Knockout-Modellen auftretenden Funktionsausfälle leiten sich aus dem Fehlen der bislang als reine Abbauprodukte angesehenen Substanzen CO und Bilirubin ab (Marilena 1997). CO ist als Mediator an der anterograden und retrograden Signalübermittlung im Hippokampus beteiligt (Verma et al. 1993). Interessanterweise führt das Fehlen von HO-1 zu einer weitaus stärkeren Debität

der Mausmutanten als das Fehlen von HO-2 (Poss & Tonegawa 1997). Funktionsstörungen des peripheren Nervensystems sind in HO-Knockout-Modellen bislang nicht gut untersucht. Für HO-2-defiziente Mäuse wurden lediglich Ejakulationsstörungen beschrieben (Burnett et al. 1998).

Im peripheren Nervensystem spielen Axon-Glia-Interaktionen eine wesentliche Rolle, an denen CO als parakrines Signal beteiligt sein könnte. Zahlreiche Axon-Glia-Interaktionen wurden bereits beschrieben. Zu den Einflüssen von Neuronen auf Schwann-Zellen zählen Effekte auf die Proliferation, die Differenzierung und Migration. In umgekehrter Weise sind Schwann-Zellen für das Überleben und für den neurochemischen Phänotyp der Neurone mitverantwortlich. Sie beeinflussen das Auswachsen und die Führung des Neuriten während der Entwicklung (Übersicht bei Reynolds & Woolf 1993). Ausserdem wurden Axon-Glia-Wechselwirkungen als wesentliche Mechanismen bei der Regeneration nach peripherer Nervenläsion erkannt (Taylor & Suter 1997). Einige Tage nach Nervenläsion kommt es zu einer massiven Schwann-Zellproliferation diesseits der Läsion (Übersicht bei Jessen & Mirsky 1997, Jessen & Mirsky 1998). Die vorausgehende HO-2 Induktion in den Schwann-Zellen könnte über CO als proliferationsförderndes Signal beteiligt sein. Befunde aus zentraler Glia zeigen eine CO-vermittelte Aktivierung der Prostaglandin E₂-Synthese (Mancuso et al. 1997). Die Vermittlung solcher indirekten Effekte ist auch für Schwann-Zellen denkbar. Neben den Effekten von CO auf die Neuron-Glia-Interaktion muss auch die Wirkung von CO auf die Gefäße in Betracht gezogen werden. CO wirkt wie NO gefäßerweiternd (Thorup et al. 1999), kann jedoch in höherer Konzentration zur Apoptose der Endothelzellen führen (Thom et al. 2000). Im Rahmen der Nervenläsion und den folgenden Reparaturvorgängen könnte von Schwann-Zellen generiertes CO auch zur Verbesserung der Durchblutung auf die Vasa nervorum wirken.

Die funktionelle Bedeutung des zweiten wesentlichen Abbauproduktes der Hämoxygenasereaktion, Biliverdin und sein unmittelbares Folgeprodukt Bilirubin, kommt erst unter pathologischen Bedingungen zur Geltung (Stocker et al. 1987). Oxidativer Stress, der unter Ischämie oder nach traumatischer Läsion auftritt und bedeutende neurotoxische Wirkungen hat, kann durch Bilirubin verhindert werden (Dore et al. 1999, Dore et al. 1999). Der neuroprotektive Effekt scheint eher in einer Verhinderung des apoptotischen als des nekrotischen Zelltods der Nervenzelle zu bestehen (Dore et al. 1999). Auch bei peripherer Nervenläsion kommt es beispielsweise im Rahmen der Wallerschen Degeneration zu erheblichem oxidativem Stress, der vor allem durch Makrophagen verursacht wird (Bruck 1997).

Ein protektiver Effekt gegenüber oxidativem Stress in noch umfassenderem Sinne kommt HO-1 zu. Zellen, die durch genetische Manipulation keine HO-1 besitzen, können sich nicht ausreichend gegen oxidativen Stress schützen (Poss & Tonegawa 1997b). HO-1 schützt Endothelzellen vor oxidativem Stress und ist essentiell für die zelluläre Eisenverwertung (Poss & Tonegawa 1997a). Diese Funktionen sind in nahezu allen Organen von Bedeutung, einschliesslich des Gehirns. Hier schützt HO-1 ebenso wie HO-2 vor oxidativem Stress und zytotoxischen Effekten, die durch beta-Amyloid-Peptide (Le et al. 1999) oder auch durch Ischämie ausgelöst werden. Kürzlich wurde erstmals von einem Patienten berichtet, der einen Gendefekt für HO-1 aufweist und durch eine persistierende hämolytische Anämie, ausgeprägte Endothelschädigung in inneren Organen als Zeichen des kontinuierlichen oxidativen Schadens, sowie durch Gedeihstörungen auffällt (Yachie et al. 1999). Die Hinweise für ausgeprägte Schäden in Leber und Lunge, die sich aus Untersuchungen an HO-1 und HO-2 defizienten Mausmutanten ergaben (Poss & Tonegawa 1997b, Dennery et al. 1998), wurden kürzlich auch für den Menschen bestätigt (Yamada et al. 2000). Patienten, die ein Lungenemphysem entwickeln, wiesen in der Promotorregion einen

langen Microsatelliten auf, der mit einer verminderten HO-1 Transkription einhergeht. Durch die häufigen hohen Belastungen in der Lunge mit reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. durch aktives und passives Rauchen) scheint damit der Lunge ein wesentlicher antioxidativer Schutzmechanismus verloren zu gehen. Auch in HO-2-defizienten Mäusen wurde eine massive Schädigung der Lunge durch oxidativen Stress und Eisenablagerung berichtet, die durch die Induktion von HO-1 nicht ausreichend kompensiert würden (Dennery et al. 1998).

Zusammen genommen sprechen die Daten aus pharmakologischen Untersuchungen und aus den genetischen HO-1- und HO-2-Defektvarianten dafür, dass die wesentliche Bedeutung der HO-2-Induktion in Schwann-Zellen nach Nervenläsion im Abbau der anfallenden Hämproteine liegt. Die dabei entstehenden Abbauprodukte Biliverdin/Bilirubin bieten Schutz vor dem im Rahmen der Degenerationsvorgänge auftretenden oxidativen Stress. Möglicherweise ist das ebenfalls entstehende CO als parakriner Mediator an lokalen Regulationsprozessen beteiligt. Die genaue physiologische und pathophysiologische Bedeutung von HO-2 wird sich erst mit Entwicklung spezifischer Blocker klären lassen.

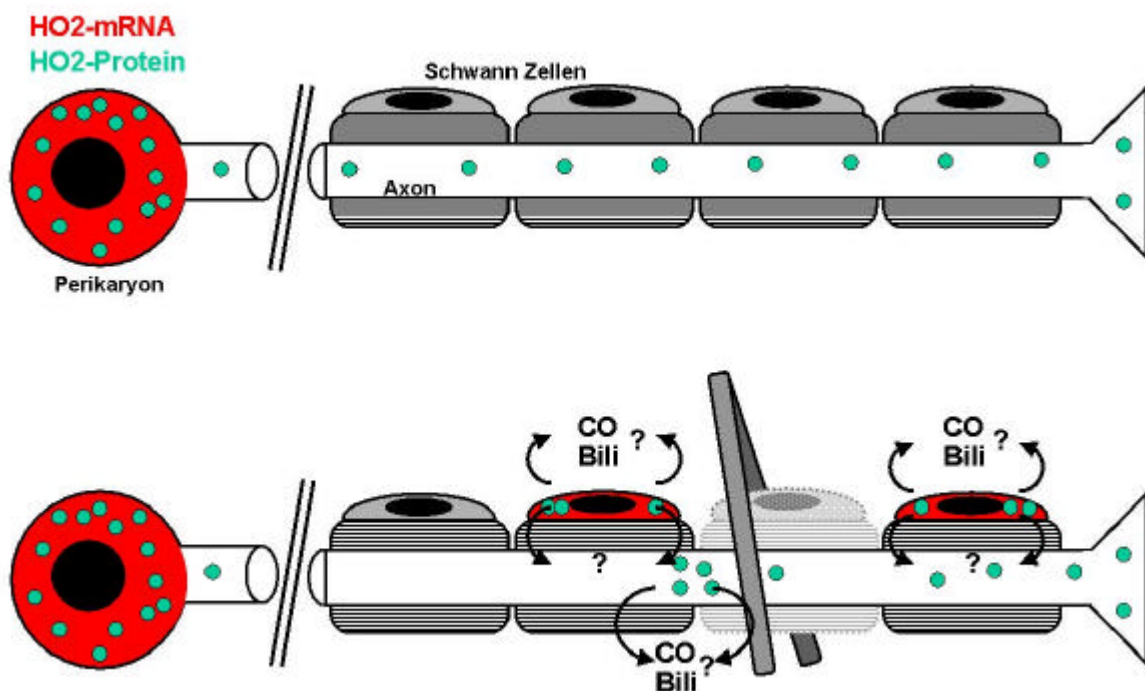


Abb. 13

Schematische Übersicht der Befunde und ihrer möglichen pathophysiologischen Bedeutung. (a) ungequetschter N. ischiadicus, (b) gequetschter N. ischiadicus.

HO-2-Protein wird anterograd und gering auch retrograd axonal transportiert und akkumuliert nach Nervenquetschung an der Läsionsstelle (b). Die im Bereich der mechanischen Schädigung liegenden Schwann-Zellen degenerieren (b). In den der Läsionsstelle angrenzenden Schwann-Zellen kommt es zu einer Induktion von HO-2-mRNA und HO-2-Protein (b). Die von HO-2 beim Abbau von Hämproteinen gebildeten Produkte Biliverdin/Bilirubin (Bili) wirken als Antioxidantien protektiv und CO ist als parakriner Mediator möglicherweise an der Axon-Glia-Kommunikation und lokalen Regulationsprozessen (z. B. Durchblutung der Läsionsstelle) beteiligt.

ZUSAMMENFASSUNG

Hämoxygenasen (HO) katalysieren den Abbau von Häm zu Biliverdin unter Entstehung von freiem Eisen und Kohlenstoffmonoxid (CO). In den vergangenen Jahren wurde für CO - früher als reines Abbauprodukt angesehen - eine Rolle als wichtiger physiologischer Mediator diskutiert. Bilirubin, das nächste Abbauprodukt des Biliverdins besitzt ausgeprägt antioxidative Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der beiden Isoenzyme HO-1 (induzierbar) und HO-2 (konstitutiv) im peripheren Nerven untersucht und Veränderungen nach Nervenläsion erfaßt.

Der Nervus ischiadicus des Meerschweinchens und der Ratte wurde als Modell gewählt und ein Organkultur-Modell entwickelt, das Nervenquetschungen *in vitro* ermöglicht. Nerven in Organkultur ohne Läsion und 24 h nach einer mechanischen Quetschung wurden im Vergleich zu frisch entnommenen Nerven hinsichtlich der Expression von HO-1 und HO-2 auf Proteinebene mittels Immunhistochemie und Western-Blot Analyse sowie auf mRNA Ebene mittels RT-PCR untersucht.

HO-1 ist in frisch entnommenen Nerven und in kultivierten Nerven konstitutiv in nicht-neuronalen Zellen vorhanden und wird nach Läsion weder qualitativ noch quantitativ wesentlich verändert exprimiert. Dagegen ist HO-2 unter normalen Bedingungen in frisch entnommenen oder in kultivierten Nerven weder auf mRNA noch auf Proteinebene nachweisbar. Nach Quetschung des Nerven und Organkultur für 24 h wurde eine axonale Akkumulation von HO-2 gesehen, die für ein geringfügiges, unter normalen Bedingungen unterhalb der Nachweisgrenze liegendes axonales Vorkommen der HO-2 spricht. Eine Induktion der Expression von HO-2 nach Quetschung wurde auf mRNA- und auf Proteinebene beobachtet und

mittels immunhistochemischer Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen Vimentin den Schwann-Zellen zugeordnet.

Anders als bisher für Hämoxxygenasen beschrieben, ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit HO-1 als ein konstitutiv exprimiertes Enzym im N. ischiadicus des Meerschweinchens und der Ratte anzusehen. Eine Nervenläsion führt dagegen zur Induktion der als konstitutiv geltenden HO-2 in Schwann-Zellen.

Die physiologische und pathophysiologische Bedeutung dieses bislang nicht beschriebenen Expressionsmusters der beiden Isoenzyme wurde noch nicht weiter untersucht. Unter Berücksichtigung der bekannten Effektormechanismen der durch HO entstehenden Produkte CO und Biliverdin/Bilirubin ist für sie eine Rolle als parakriner Regulator und als antioxidativer Schutz anzunehmen.

LITERATUR:

- Belyavsky, A., Vinogradova, T. & Rajewsky, K. PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 2919-2932, 1989
- Brück, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* **7**: 741-752, 1997
- Burnett, A.L., Johns, D.G., Kriegsfeld, L.J., Klein, S.L., Calvin, D.C., Demas, G.E., Schramm, L.P., Tonegawa, S., Nelson, R.J., Snyder, S.H. & Poss, K.D. Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nat Med* **4**: 84-87, 1998
- Canning, B.J. & Fischer, A. Localization of heme oxygenase-2 immunoreactivity to parasympathetic ganglia of human and guinea-pig airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**: 279-285, 1998
- Cantoni, L., Gibbs, A.H. & De Matteis, F. Loss of haem and haemoproteins during the generation of superoxide anion and hydrogen peroxide: a pathway not involving production of carbon monoxide. *Int J Biochem* **13**: 823-830, 1981
- De Flora, S., Rosenkranz, H.S. & Klopman, G. Structural basis of antimutagenicity of chemicals towards 4- nitroquinoline 1-oxide in *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis* **9**: 39-45, 1994

Dennerly, P.A., McDonagh, A.F., Spitz, D.R., Rodgers, P.A. & Stevenson, D.K.

Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radic Biol Med* **19**: 395-404, 1995

Dennerly, P.A., Spitz, D.R., Yang, G., Tatarov, A., Lee, C.S., Shegog, M.L. & Poss,

K.D. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2. *J Clin Invest* **101**: 1001-1011, 1998

Dore, S., Sampei, K., Goto, S., Alkayed, N.J., Guastella, D., Blackshaw, S.,

Gallagher, M., Traystman, R.J., Hurn, P.D., Koehler, R.C. & Snyder, S.H. Heme oxygenase-2 is neuroprotective in cerebral ischemia. *Mol Med* **5**: 656-663, 1999

Dore, S., Takahashi, M., Ferris, C.D., Hester, L.D., Guastella, D. & Snyder, S.H.

Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2445-2450, 1999

Elbirt, K.K. & Bonkovsky, H.L. Heme oxygenase: recent advances in understanding

its regulation and role. *Proc Assoc Am Physicians* **111**: 438-447, 1999

Ewing, J.F., Haber, S.N. & Maines, M.D. Normal and heat-induced patterns of

expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. *J Neurochem* **58**: 1140-1149, 1992

Ewing, J.F. & Maines, M.D. Histochemical localization of heme oxygenase-2 protein

and mRNA expression in rat brain. *Brain Res Brain Res Protoc* **1**: 165-174, 1997

- Farrera, J.A., Jauma, A., Ribo, J.M., Peire, M.A., Parellada, P.P., Roques-Choua, S., Bienvenue, E. & Seta, P. The antioxidant role of bile pigments evaluated by chemical tests. *Bioorg Med Chem* **2**: 181-185, 1994
- Fernandez, E., Pallini, R. & Mercanti, D. Effects of topically administered nerve growth factor on axonal regeneration in peripheral nerve autografts implanted in the spinal cord of rats. *Neurosurgery* **26**: 37-42, 1990
- Fischer, A. & Hoffmann, B. Nitric oxide synthase in neurons and nerve fibers of lower airways and in vagal sensory ganglia of man. Correlation with neuropeptides. *Am J Respir Crit Care Med* **154**: 209-216, 1996
- Friebe, A., Schultz, G. & Koesling, D. Sensitizing soluble guanylyl cyclase to become a highly CO-sensitive enzyme. *Embo J* **15**: 6863-6868, 1996
- Fukuda, K., Panter, S.S., Sharp, F.R. & Noble, L.J. Induction of heme oxygenase-1 (HO-1) after traumatic brain injury in the rat. *Neurosci Lett* **199**: 127-130, 1995
- Galbraith, R. Heme oxygenase: who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* **222**: 299-305, 1999
- Geddes, J.W., Pettigrew, L.C., Holtz, M.L., Craddock, S.D. & Maines, M.D. Permanent focal and transient global cerebral ischemia increase glial and neuronal expression of heme oxygenase-1, but not heme oxygenase-2, protein in rat brain. *Neurosci Lett* **210**: 205-208, 1996

- Grozdanovic, Z. & Gossrau, R. Expression of heme oxygenase-2 (HO-2)-like immunoreactivity in rat tissues. *Acta Histochem* **98**: 203-214, 1996
- Grube, D. & Weber, E. Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. I. dilution-dependent staining of G-cells by antisera and non-immune sera. *Histochemistry* **65**: 223-237, 1980
- Hauri, H.P. & Bucher, K. Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal Biochem* **159**: 386-389, 1986
- Hawkins, R.D., Zhuo, M. & Arancio, O. Nitric oxide and carbon monoxide as possible retrograde messengers in hippocampal long-term potentiation. *J Neurobiol* **25**: 652-665, 1994
- Hopkins, P.N., Wu, L.L., Hunt, S.C., James, B.C., Vincent, G.M. & Williams, R.R. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**: 250-255, 1996
- Immenschuh, S., Hinke, V., Ohlmann, A., Gifhorn-Katz, S., Katz, N., Jungermann, K. & Kietzmann, T. Transcriptional activation of the haem oxygenase-1 gene by cGMP via a cAMP response element/activator protein-1 element in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* **334**: 141-146, 1998a
- Immenschuh, S., Kietzmann, T., Hinke, V., Wiederhold, M., Katz, N. & Muller-Eberhard, U. The rat heme oxygenase-1 gene is transcriptionally induced via the

protein kinase A signaling pathway in rat hepatocyte cultures. *Mol Pharmacol* **53**: 483-491, 1998b

Iselin, C.E., Alm, P., Schaad, N.C., Larsson, B., Graber, P. & Andersson, K.E.

Localization of nitric oxide synthase and haemoxygenase, and functional effects of nitric oxide and carbon monoxide in the pig and human intravesical ureter.

Neurourol Urodyn **16**: 209-227, 1997

Ishii, D.N. & Maniatis, G.M. Haemin promotes rapid neurite outgrowth in cultured

mouse neuroblastoma cells. *Nature* **274**: 372-374, 1978

Jessen, K.R. & Mirsky, R. Embryonic Schwann cell development: the biology of

Schwann cell precursors and early Schwann cells. *J Anat* **191**: 501-505, 1997

Jessen, K.R. & Mirsky, R. Origin and early development of Schwann cells. *Microsc*

Res Tech **41**: 393-402, 1998

Kharitonov, V.G., Sharma, V.S., Pilz, R.B., Magde, D. & Koesling, D. Basis of

guanylate cyclase activation by carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:

2568-2571, 1995

Kikuchi, G. & Yoshida, T. Function and induction of the microsomal heme

oxygenase. *Mol Cell Biochem* **53-54**: 163-183, 1983

Kusner, L.L., Kim, E. & Kaminski, H.J. Heme oxygenase-2 expression at rat

neuromuscular junctions. *Neurosci Lett* **273**: 143-146, 1999

- Kutty, R.K., Kutty, G., Nagineni, C.N., Hooks, J.J., Chader, G.J. & Wiggert, B. RT-PCR assay for heme oxygenase-1 and heme oxygenase-2: a sensitive method to estimate cellular oxidative damage. *Ann N Y Acad Sci* **738**: 427-430, 1994
- Labbe, R.F., Vreman, H.J. & Stevenson, D.K. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clin Chem* **45**: 2060-2072, 1999
- Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Levere, R.D., Kappas, A. & Abraham, N.G. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5987-5991, 1994
- Le, W.D., Xie, W.J. & Appel, S.H. Protective role of heme oxygenase-1 in oxidative stress-induced neuronal injury. *J Neurosci Res* **56**: 652-658, 1999
- Levere, R.D. & Granick, S. Control of hemoglobin synthesis in the cultured chick blastoderm by delta-aminolevulinic acid synthetase: increase in the rate of hemoglobin formation with delta-aminolevulinic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**: 134-137, 1965
- Liu, N., Wang, X., McCoubrey, W.K. & Maines, M.D. Developmentally regulated expression of two transcripts for heme oxygenase-2 with a first exon unique to rat testis: control by corticosterone of the oxygenase protein expression. *Gene* **241**: 175-183, 2000

Liuzzi, F.J. & Tedeschi, B. Peripheral nerve regeneration. *Neurosurg Clin N Am* **2**:

31-42, 1991

Magnusson, S., Ekstrom, T.J., Elmer, E., Kanje, M., Ny, L. & Alm, P. Heme

oxygenase-1, heme oxygenase-2 and biliverdin reductase in peripheral ganglia from rat, expression and plasticity. *Neuroscience* **95**: 821-829, 2000

Magnusson, S. & Kanje, M. Differential macrophage responses following pre- and

postganglionic axotomy. *Neuroreport* **9**: 841-846, 1998

Maines, M.D. Heme Oxygenase and Heme Degrading Systems. In *Heme Oxygenase:*

Clinical Applications and Functions. ed. Maines, M.D. pp. 63-108. Boca Raton:

CRC Press. 1992

Maines, M.D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and

clinical applications. *Faseb J* **2**: 2557-2568, 1988

Maines, M.D., Trakshel, G.M. & Kutty, R.K. Characterization of two constitutive forms

of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem* **261**: 411-419, 1986

Mancuso, C., Pistritto, G., Tringali, G., Grossman, A.B., Preziosi, P. & Navarra, P.

Evidence that carbon monoxide stimulates prostaglandin endoperoxide synthase activity in rat hypothalamic explants and in primary cultures of rat hypothalamic astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* **45**: 294-300, 1997

- Marilena, G. New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin. *Biochem Mol Med* **61**: 136-142, 1997
- Marquez, J., Perez-Perez, M., Naves, F.J. & Vega, J.A. Effect of spinal cord and peripheral nerve injury on human cutaneous sensory corpuscles. An immunohistochemical study. *J Peripher Nerv Syst* **2**: 49-59, 1997
- Matsuoka, Y., Kitamura, Y., Kakimura, J. & Taniguchi, T. Expression of heme oxygenase-1 mediated by non-NMDA and metabotropic receptors in glial cells: possible involvement of reactive oxygen species production and protein kinase C activation. *Neuropharmacology* **38**: 825-834, 1999
- McCoubrey, W.K., Jr., Eke, B. & Maines, M.D. Multiple transcripts encoding heme oxygenase-2 in rat testis: developmental and cell-specific regulation of transcripts and protein. *Biol Reprod* **53**: 1330-1338, 1995
- McCoubrey, W.K., Jr., Huang, T.J. & Maines, M.D. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* **247**: 725-732, 1997
- McCoubrey, W.K., Jr. & Maines, M.D. The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2. *Gene* **139**: 155-161, 1994

- Nakagami, T., Toyomura, K., Kinoshita, T. & Morisawa, S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: anti-complement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochim Biophys Acta* **1158**: 189-193, 1993
- Neuzil, J. & Stocker, R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Lett* **331**: 281-284, 1993
- Oberbäumer, I., Moser, D. & Bachmann, S. Nitric oxide synthase 1 mRNA: tissue-specific variants from rat with alternative first exons. *Biol Chem* **379**: 913-919, 1998
- Porcher, C., Orsoni, P., Berdah, S., Monges, G. & Mazet, B. Distribution of heme oxygenase 2 in nerves and c-kit(+) interstitial cells in human stomach. *Histochem Cell Biol* **112**: 317-322, 1999
- Poss, K.D. & Tonegawa, S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10919-10124, 1997b
- Poss, K.D. & Tonegawa, S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10925-30, 1997a
- Prabhakar, N.R., Dinerman, J.L., Agani, F.H. & Snyder, S.H. Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1994-1997, 1995

- Raff, H. & Jankowski, B. Inhibition of aldosterone release by hypoxia in vitro: interaction with carbon monoxide. *J Appl Physiol* **76**: 689-693, 1994
- Raju, V.S., McCoubrey, W.K., Jr. & Maines, M.D. Regulation of heme oxygenase-2 by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim Biophys Acta* **1351**: 89-104, 1997
- Reynolds, M.L. & Woolf, C.J. Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol* **3**: 683-693, 1993
- Schmidt, H.H. NO, CO and OH. Endogenous soluble guanylyl cyclase-activating factors. *FEBS Lett* **307**: 102-107, 1992
- Schuller, D.J., Wilks, A., Ortiz de Montellano, P.R. & Poulos, T.L. Crystal structure of human heme oxygenase-1. *Nat Struct Biol* **6**: 860-867, 1999
- Serfass, L. & Burstyn, J.N. Effect of heme oxygenase inhibitors on soluble guanylyl cyclase activity. *Arch Biochem Biophys* **359**: 8-16, 1998
- Shibahara, S., Sato, M., Muller, R.M. & Yoshida, T. Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur J Biochem* **179**: 557-563, 1989
- Shinomura, T., Nakao, S. & Mori, K. Reduction of depolarization-induced glutamate release by heme oxygenase inhibitor: possible role of carbon monoxide in synaptic transmission. *Neurosci Lett* **166**: 131-134, 1994

- Sofroniew, M.V., Bush, T.G., Blumauer, N., Lawrence, K., Mucke, L. & Johnson, M.H. Genetically-targeted and conditionally-regulated ablation of astroglial cells in the central, enteric and peripheral nervous systems in adult transgenic mice. *Brain Res* **835**: 91-95, 1999
- Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. & Ames, B.N. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* **235**: 1043-6, 1987
- Takeda, A., Onodera, H., Sugimoto, A., Itoyama, Y., Kogure, K. & Shibahara, S. Increased expression of heme oxygenase mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Brain Res* **666**: 120-124, 1994
- Taylor, V. & Suter, U. Molecular biology of axon-glia interactions in the peripheral nervous system. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **56**: 225-256, 1997
- Tenhunen, R., Marver, H.S. & Schmid, R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**: 748-755, 1968
- Thom, S.R., Fisher, D., Xu, Y.A., Notarfrancesco, K. & Ischiropoulos, H. Adaptive responses and apoptosis in endothelial cells exposed to carbon monoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1305-1310, 2000

- Thorup, C., Jones, C.L., Gross, S.S., Moore, L.C. & Goligorsky, M.S. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. *Am J Physiol* **277**: F882-889, 1999
- Udem, B.J., Ellis, J.L., Meeker, S., Fischer, A. & Canning, B.J. Inhibition by zinc protoporphyrin-IX of vasoactive intestinal peptide-induced relaxations of guinea pig isolated trachea. *J Pharmacol Exp Ther* **278**: 964-970, 1996
- Valaes, T., Petmezaki, S., Henschke, C., Drummond, G.S. & Kappas, A. Control of jaundice in preterm newborns by an inhibitor of bilirubin production: studies with tin-mesoporphyrin. *Pediatrics* **93**: 1-11, 1994
- Verma, A., Hirsch, D.J., Glatt, C.E., Ronnett, G.V. & Snyder, S.H. Carbon monoxide: a putative neural messenger [see comments] [published erratum appears in Science 1994 Jan 7;263(5143):15]. *Science* **259**: 381-384, 1993
- Vollerthun, R., Hohler, B. & Kummer, W. Guinea-pig sympathetic postganglionic neurones contain haem oxygenase-2. *Neuroreport* **7**: 173-176, 1995
- Wu, T.W., Wu, J., Li, R.K., Mickle, D. & Carey, D. Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. *Biochem Cell Biol* **69**: 683-688, 1991
- Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y. & Koizumi, S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest* **103**: 129-135, 1999

- Yamada, N., Yamaya, M., Okinaga, S., Nakayama, K., Sekizawa, K., Shibahara, S. & Sasaki, H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* **66**: 187-195, 2000
- Yoshida, T. & Kikuchi, G. Sequence of the reaction of heme catabolism catalyzed by the microsomal heme oxygenase system. *FEBS Lett* **48**: 256-261, 1974
- Zakhary, R., Gaine, S.P., Dinerman, J.L., Ruat, M., Flavahan, N.A. & Snyder, S.H. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 795-798, 1996
- Zhuo, M., Laitinen, J.T., Li, X.C. & Hawkins, R.D. On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long-term potentiation in the hippocampus. *Learn Mem* **5**: 467-480, 1998

7. Lebenslauf

Geburtsdatum: 12. April 1971 in Darmstadt
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: verheiratet mit Dr. Axel Fischer, Arzt

Schulbildung

1977 - 1981 American School Yaoundé, Kamerun
1981 - 1990 Schuldorf Bergstrasse, Seeheim-Jugenheim

Berufsausbildung

1990-1992 Medizinisch-Technische Labor-Assistentin (MTLA), Klinikum der Universität Frankfurt
1992-1993 MTLA, Histologie Labor, Praxis für Dermatologie Dr. Vranes, Darmstadt

Medizinstudium

1993-1995 Philipps-Universität Marburg
03/1995 Ärztliche Vorprüfung
03/1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1996-1999 Justus-Liebig-Universität Giessen
03/1996 Beginn der Promotionsarbeit, Institut für Anatomie & Zellbiologie
08/1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1998 Praktisches Jahr:
-09/1999 Innere Medizin: Universität Giessen
Chirurgie: Universität Ferrara, Italien
Dermatologie: Universität Giessen
10/1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Abschluss des Medizinstudiums (Gesamtnote: Gut)

Beruflicher Werdegang

seit 01/2000 Ärztin im Praktikum
Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie,
Universitätsklinikum Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Kummer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die stets engagierte und hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit.

Für die freundliche Untersützung, die gute Zusammenarbeit und die schöne Zeit danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei („in order of appearance“):

Herrn Martin Bodenbenner, Frau Silke Wiegand, Frau Petra Hartmann, Herrn Dr. Rainer Haberberger, Herrn Dr. Peter König, Frau Tamara Fischbach, Frau Elke Richter, Frau Karola Michael, Frau PD Dr. Monika Wimmer, Frau Claudia Tag, Herrn Dr. Reinhard Vollerthun, Frau Patricia Berger, Frau Annette Seng, Frau Astrid Leyerer, Frau Anna Goldenberg.

Meiner Christa Stedele möchte ich für ihre grossartige Freundschaft und ihre „Hilfe in allen Lebenslagen“ von ganzem Herzen danken. Auf sie ist immer Verlass.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau Dr. Gerda Sterry. Sie hat mich durch ihr anteilnehmendes Interesse immer wieder motiviert.

Mein Dank gilt vor allem meinen Eltern und meinem Bruder Andreas, die mir diesen Weg ermöglicht haben.

Nicht zuletzt danke ich meinem Ehemann Axel für sein liebevolles Verständnis und seine grosse Geduld.